

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Jakub Vávra

**Příprava plazmidu, exprese, izolace a charakterizace hemového
senzorového proteinu Bach1**
Preparation of plasmid, expression, purification and characterization of a heme
sensor, Bach1

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za vstřícné jednání a profesionální přístup při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Martinu Stráňavovi, Ph.D., Mgr. Veronice Fojtíkové a Mgr. Alžbětě Lengálové za trpělivost a pomoc při prováděných experimentech. V neposlední řadě patří velký dík také mé rodině a přítelkyni za podporu nejen během tvorby této bakalářské práce, ale i v průběhu celého studia.

Abstrakt

Hemoproteiny jsou nezastupitelnou součástí mnoha živých organismů. Participace v přenosu kyslíku a jeho uskladnění, přenos elektronů v dýchacím řetězci či enzymová katalýza reakcí, v nichž vystupuje kyslík, popřípadě peroxid vodíku, patří mezi významné funkce hemoproteinů. V současnosti se do popředí vědeckého zájmu dostává relativně nedávno objevená skupina hemoproteinů vykazující sensorové funkce. Tyto hemoproteiny jsou schopné detekovat změny koncentrace hemu (sensorové proteiny detekující hem) či plynu (hemové sensorové proteiny detekující plyny) v buňce a na základě těchto změn vykazovat další funkce.

Předmětem předkládané bakalářské práce je příprava vhodného plazmidu pro prokaryotní expresi sensorového proteinu Bach1, který detekuje hem a má funkci transkripčního faktoru. Zmíněný protein byl posléze úspěšně exprimován a izolován z buněk *E. coli* BL-21(DE3). Následně byly hledány postupy, jak připravit sensorový protein Bach1 detekující hem v jeho „apoformě“ a „holoformě“ a byla provedena předběžná charakterizace tohoto proteinu.

Klíčová slova: hemové proteiny; sensorové proteiny detekující hem; Bach1; příprava a izolace plazmidu; exprese a izolace proteinu

Abstract

Hemeproteins are an irreplaceable part of many living organisms. Participation in oxygen transfer and storage, transmission of electrons in the respiratory chain or enzymatic catalysis of reactions involving oxygen or hydrogen peroxide, are very important functions of hemeproteins. Recently a new group of hemeproteins has been described. Members of this group exhibit sensor functions. These hemeproteins are able to detect changes in concentration of heme in the cell (Heme-Sensor Proteins) or in concentration of gas in the cell (Heme-Based Gas Sensor Proteins). They exhibit other functions as a result of the heme or gas concentration changes.

The subject of this bachelor thesis is the preparation of a suitable plasmid for the prokaryotic expression of heme-sensor protein with the function of transcription factor called Bach1 in *E. coli*. This protein was then successfully expressed and isolated from *E. coli* BL-21(DE3) cells. We were also trying to find suitable methods for preparing Bach1 protein in its “apoform” and “holoform”. Preliminary characterization of this protein was also performed.

Key words: hemeproteins; Heme Sensor Proteins; Bach1;
preparation and isolation of plasmid; expression and isolation of protein

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
1 Použité zkratky	8
2 Teoretický úvod.....	12
2.1 Vlastnosti a funkce hemoproteinů	12
2.2 Hemové sensorové proteiny detekující plyny	13
2.2.1 Hemové sensorové proteiny detekující kyslík	14
2.2.2 Hemové sensorové proteiny detekující oxid uhelnatý	15
2.3 Sensorové proteiny detekující hem	16
2.3.1 Význam thiolátové skupiny cysteinu v sensorové doméně	17
2.3.2 CP motiv.....	17
2.3.3 Disociační konstanta a rychlostní konstanty hemu	18
2.3.4 Záměna ligandů hemu v závislosti na redoxním stavu iontu železa v hemu	19
2.3.5 Flexibilita	20
2.3.6 Inhibitor proteosyntézy, který je regulovaný hemem (HRI)	20
2.3.7 Neuronální PAS protein 2 (NPAS2)	22
2.4 Bach1	22
2.5 Elektromigrační metody	25
2.5.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	25
2.5.2 Elektroforéza v agarosovém gelu	26
2.6 Chromatografické metody	26
2.6.1 Gelová filtrace	27
2.6.2 Afinity chromatografie	27
2.7 Metody molekulární biologie	28

2.7.1	Izolace nukleových kyselin	28
2.7.2	Štěpení řetězců DNA.....	28
2.7.3	Amplifikace DNA	28
2.7.4	Sekvenování DNA.....	28
2.7.5	Polymerasová řetězová reakce	29
3	Cíle bakalářské práce	30
4	Materiál a metody.....	31
4.1	Použité přístroje.....	31
4.2	Použité chemikálie a materiál.....	32
4.3	Použité metody	36
4.3.1	Izolace plazmidové DNA z filtračního papíru	36
4.3.2	Transformace buněk <i>E. coli</i> DH5 α a <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	37
4.3.3	Izolace plazmidové DNA	38
4.3.4	Sekvenace genu pro Bach1 vloženého ve vektoru pET-21c(+) a střední části genu pro Bach1 vloženého ve vektoru pcDNA3.1(-).....	39
4.3.5	Přenesení genu pro Bach1 z vektoru pcDNA3.1(-) do vektoru pET-21c(+)	39
4.3.6	Horizontální agarosová elektroforéza	41
4.3.7	Místně cílená mutageneze	42
4.3.8	Exprese proteinu Bach1	42
4.3.9	Izolace proteinu Bach1 z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	43
4.3.10	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	45
4.3.11	Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA a proteinu v roztoku	46
4.3.12	Spektrofotometrická charakterizace proteinu Bach1	47
5	Výsledky.....	49
5.1	Plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag poskytnutý spolupracujícím pracovištěm	49
5.2	Příprava vlastního plazmidu pET-21c(+)/Bach1-Histag	51

5.3	Exprese proteinu Bach1	57
5.4	Izolace proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ a „apoformě“	57
5.5	Základní charakterizace proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ a „apoformě“	62
6	Diskuze.....	63
7	Závěr.....	67
8	Seznam použitých zdrojů	68

1 Použité zkratky

<i>AfGcHK</i>	histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5
ALA-synthasa	synthasa δ -aminolevulové kyseliny
AU	z angl. „arbitrary units“, relativní jednotka absorbance
Bach1	senzorový protein detekující hem, pojmenování vychází z názvu významné domény tohoto proteinu (BTB doména) a názvu rodiny transkripčních faktorů, do které tento protein patří (CNC), tedy BTB a CNC homolog 1
BCA	bicinchoninová kyselina
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
BMAL1	transkripční faktor tvořící heterodimer s proteinem NPAS2, zkratka vychází z anglického názvu „ B rain and m uscle a ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 “
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
BTB doména	jedna z významných domén proteinu Bach1, z anglického pojmenování „ B road complex – T ramtrack – B rick – a – brack domain“
CNC rodina	název rodiny transkripčních faktorů, z anglického pojmenování „ C ap' n ' C ollar“ rodina
CP motiv	motiv vyskytující se v polypeptidovém řetězci charakteristický výskytem aminokyselin cysteinu a prolinu vedle sebe
DMSO	dimethylsulfoxid

DNA	deoxyribonukleová kyselina
Ec DOS	hemový senzorový protein detekující kyslík, jehož funkční doména vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu vedoucí k rozkladu cyklického di-guanylnmonofosfátu, zkratka vychází z anglického názvu „ <i>Echerichia coli</i> d irect o xxygen s ensor“
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FixL	hemový senzorový protein detekující kyslík, který vykazuje kinasovou aktivitu; přenosem fosfátové skupiny z ATP na transkripční faktor FixJ reguluje protein FixL genovou expresi během fixace dusíku
Fur	transkripční faktor ovlivňující metabolismus železa u prokaryotických organismů, název pochází z anglického „ f erric u ptake r egulator“
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv objevuje: „ c GMp specific phosphodiesterases“, „ a denyl cyclases“ a „ <i>E. coli</i> f ormate hydrogenlyase transcriptional activator“
GTP	guanosintrifosfát
Hb	hemoglobin
HO-1	hemoxigenasa-1
HRI	inhibitor proteosyntézy, který je regulovaný hemem
huHb	lidský hemoglobin
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
K_d	rovnovážná disociační konstanta

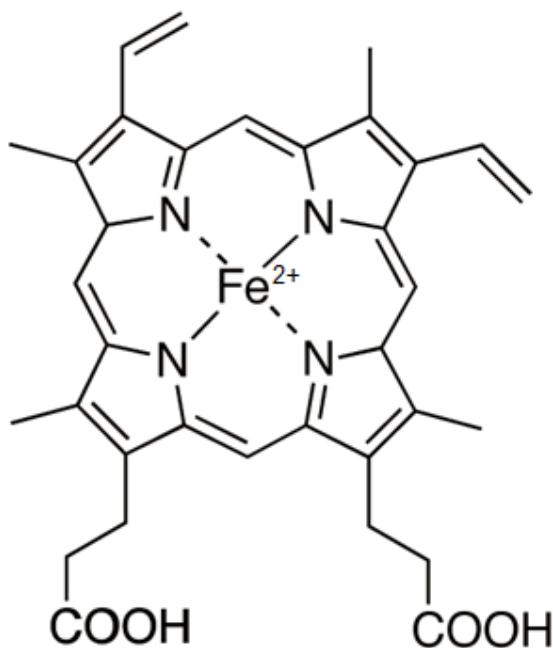
k_{off}	rychlostní konstanta disociace
k_{on}	rychlostní konstanta vzniku vazby
LB agar	Luria Broth agar
LB médium	Luria Broth médium
MafK	svalovoaponeurotický fibrosarkomový protein K
Maf proteiny	svalovoaponeurotické fibrosarkomové proteiny, z anglického „ m usculo a poneurotic f ibrosarcoma proteins“
MARE	Maf rozpoznávací element
NPAS2	neuronální PAS protein 2
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“
PCR	polymerasová řetězová reakce
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
sukcinyl-CoA	sukcinylkoenzym A
TAE pufr	pufr obsahující 0,04 mol.l ⁻¹ Tris-acetát; pH 8.2 a 1 mmol.l ⁻¹ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-VIS spektroskopie	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostně-objemová procenta
YddV	<p>diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény, zkratka YddV vychází z označení genu pro tento protein (<i>yddv</i>), funkce tohoto genu nebyla v době objevení známa</p>

2 Teoretický úvod

2.1 Vlastnosti a funkce hemoproteinů

Objev hemoproteinů se datuje již do poloviny devatenáctého století [1]. Jedná se o bílkoviny obsahující ve své struktuře ionty železa vázané s porfýrinem do komplexu, který se nazývá hem. Hem tvoří čtyři pyrolová jádra spojená čtyřmi methinovými můstky [2]. Tato planární konjugovaná struktura se označuje termínem porfín. Na uhlíkových atomech, které se neúčastní spojení pyrolových jader, se mohou vyskytovat různé substituenty. Jsou-li takto obsazeny všechny zmíněné uhlíkové atomy, vzniká derivát porfínu zvaný porfýrin [3]. Dle počtu a uspořádání substituentů rozlišujeme několik izomerů porfýrinu, z nichž se v hemoproteinech vyskytuje jako prostetická skupina izomer zvaný protoporfýrin IX. Tento izomer obsahuje ve své struktuře následující substituenty: dva vinylové zbytky, dva propionáty a čtyři methylové skupiny [4]. Je-li ve středu struktury protoporfýrinu IX vázán ke čtyřem atomům dusíku jednotlivých pyrolových jader ion železa, vzniká hem typu b [5]. Hemoproteiny tedy ve své struktuře obsahují hem typu b (viz obrázek 1).



Obrázek 1. Struktura hemu b, převzato z [6] a upraveno.

Kromě čtyř vazeb s pyrolovými atomy dusíku v rovině porfyrinu je ion železa schopen vytvářet koordinační vazby až se dvěma dalšími ligandy v rovině kolmé na rovinu porfyrinu [2]. Těmito ligandy mohou být například thiolátová skupina cysteinu či imidazolová skupina histidinu. Interakce s ligandy umožňuje vazbu hemu do struktury proteinů a tím vznik hemoproteinů [7].

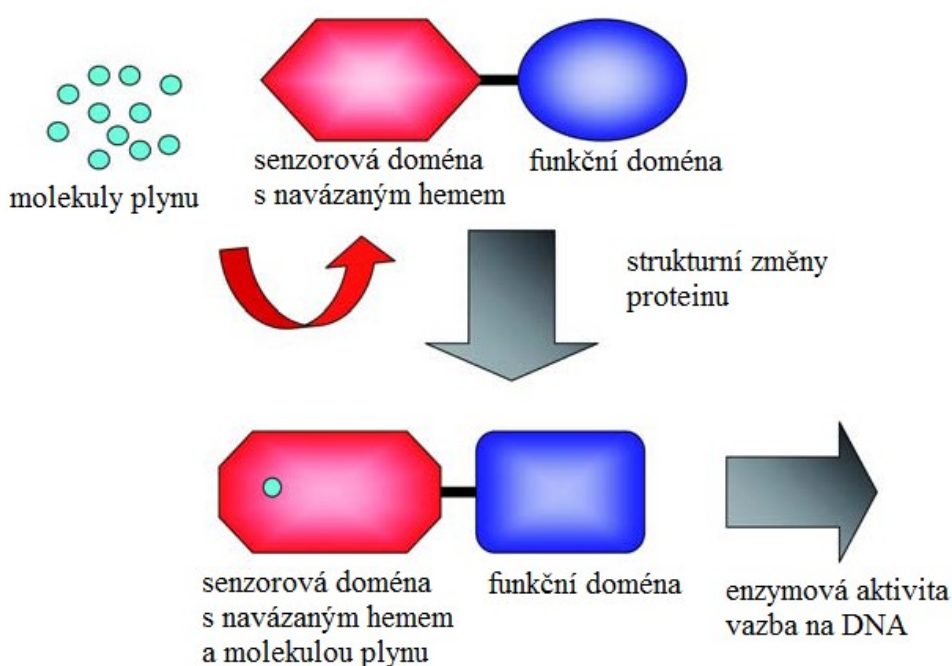
Hemoproteiny jsou významnou součástí organismů umožňující průběh mnoha důležitých procesů. Hemoproteiny mají v organismech následující funkce:

- 1) Jednou z nejznámějších funkcí hemoproteinů je jejich participace v přenosu kyslíku (hemoglobin), případně v jeho uchovávání (myoglobin). V těchto hemoproteinech je kyslík jedním z ligandů vázaných k iontu železa kolmo na rovinu porfyrinu [8].
- 2) Přenos elektronů zprostředkovaný cytochromy v dýchacím řetězci je další nezbytnou funkcí hemoproteinů, mezi něž zmiňované cytochromy patří. Tento přenos je umožněn změnou mocenství iontu železa mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} . Rozlišujeme více druhů cytochromů, které se navzájem liší substituenty na pyrolových jádrech. Přenos elektronů mezi jednotlivými cytochromy je umožněn právě jejich různou substitucí, díky níž mají odlišný elektrochemický potenciál [2].
- 3) Hemoproteiny mohou také působit jako enzymy. Katalyzují například reakce, jichž se účastní molekulární kyslík (cytochrom P450, NO synthasa) nebo peroxid vodíku (peroxidasa) či reakci rozkladu peroxidu vodíku (katalasa) [7].
- 4) Relativně nedávno byly objeveny nové typy hemoproteinů, v nichž má hem funkci signální molekuly. Vazba hemu na protein či disociace hemu z proteinu, případně interakce plynu s hemem působí jako signál, který aktivuje či inaktivuje funkci těchto hemoproteinů. Tuto skupinu hemoproteinů nazýváme hemové senzorové proteiny a dle jejich mechanismu působení je rozdělujeme na senzorové proteiny detekující hem a hemové senzorové proteiny detekující plyny [7].

2.2 Hemové senzorové proteiny detekující plyny

Jedná se o skupinu hemoproteinů, v jejichž struktuře lze rozlišit dvě důležité domény. Senzorová doména detekuje plyny. Běžně se nachází na N-konci hemoproteinů. Nezbytnou součástí této domény je molekula hemu vázaná k senzorové doméně pevnou koordinační vazbou. Funkční doména na základě dostupnosti konkrétních plynů vykonává funkci specifickou pro daný protein. Tato doména se běžně nachází na C-konci popisovaných

senzorových hemoproteinů a dle konkrétního zástupce může vykazovat například kinasovou aktivitu či schopnost vazby na DNA. V praxi se při dostatečném množství plynu naváže jeho molekula na senzorovou doménu, konkrétně vytvoří šestý ligand iontu železa hemu. Tato vazba představuje primární signál a způsobí strukturní změny senzorové domény. Tyto strukturní změny představují sekundární signál, jenž je přenášen do funkční domény a ovlivňuje zde konkrétní funkce proteinu [6]. Celý tento mechanismus znázorňuje obrázek 2.



Obrázek 2. Mechanismus detekce a přenosu signálu ve skupině hemových senzorových proteinů detekujících plyny, převzato z [7] a upraveno.

Byly popsány hemové senzorové proteiny detekující kyslík, oxid dusnatý či oxid uhelnatý. Nedávno byla diskutována možnost existence hemových senzorových proteinů detekujících sulfan [6].

2.2.1 Hemové senzorové proteiny detekující kyslík

Tuto skupinu proteinů lze rozdělit do tří hlavních skupin dle uspořádání senzorové domény. Jedná se o proteiny s PAS doménou, GAF doménou a globinovou strukturou [6].

Protein regulující fixaci dusíku L (FixL) obsahuje ve své struktuře PAS doménu. PAS doména představuje strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů. PAS je akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje:

„*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate arylhydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single minded protein“ [6]. Jedná se o první protein, u nějž byla popsána schopnost detekovat plyn, respektive kyslík [9]. Hlavní výskyt proteinu FixL je v bakteriích (*Shinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*). Na základě obsahu kyslíku v okolí bakterie ovlivňuje FixL expresi proteinů účastnících se fixace dusíku a anaerobní respirace [6].

Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (YddV) obsahuje senzorovou doménu, která má globinovou strukturu, a funkční doménu vykazující diguanylátcyklasovou aktivitu. Tato aktivita se manifestuje tak, že ze dvou molekul GTP vzniká cyklický di-guanylmofosfát. Zkratka YddV vychází z označení genu pro tento protein (*yddv*), jehož funkce nebyla v době objevení známa. Protein YddV se vyskytuje v bakterii *Escherichia coli*, v níž tvoří komplex s proteinem Ec Dos. Toto označení je zkratkou plného názvu tohoto proteinu v anglickém jazyce „*Escherichia coli* direct oxygen sensor“. Protein Ec Dos je dalším senzorovým proteinem detekujícím kyslík, jehož funkční doména vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu. Zmíněné dva proteiny tedy vykazují antagonistické funkce. Při nadprodukci YddV vzniká v bakterii nadbytek cyklického di-guanylmofosfátu. Tento sled událostí vede k přechodu bakterie do stavu biofilmu [10]. Uvedený přechod je běžně doprovázen výraznými morfologickými a fyziologickými změnami. Některé bakterie vykazují ve stavu biofilmu odolnost vůči antibiotikům či dokonce vůči imunitnímu systému hostitele (chronická onemocnění) [11,12].

2.2.2 Hemové senzorové proteiny detekující oxid uhelnatý

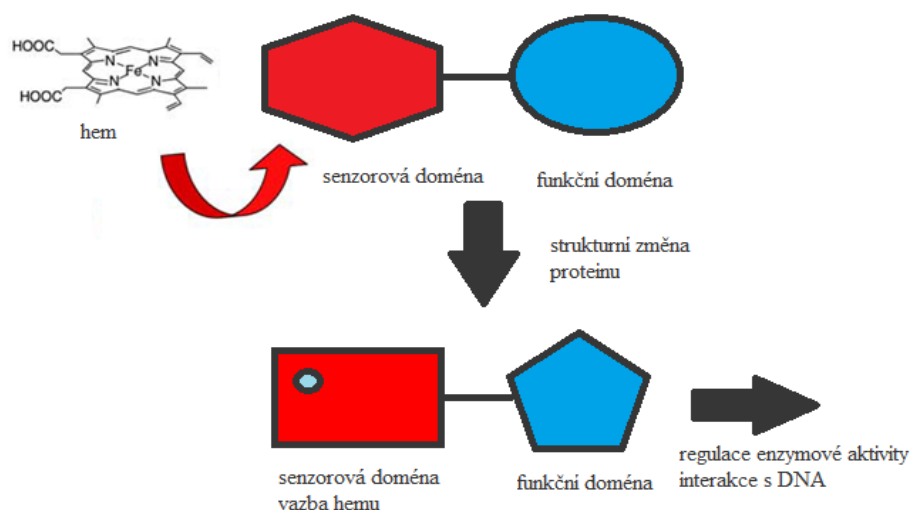
Cystathion- β -synthasa je enzym katalyzující tvorbu cystathioninu ze serinu a homocysteinu. Tato reakce je součástí odbourávání uhlíkového skeletu aminokyseliny methioninu a zároveň biosyntézy aminokyseliny cysteinu [8]. Je také klíčovým enzymem při odbourávání homocysteinu [6]. Při poškození cystathion- β -synthasy může docházet k hyperhomocysteinemii, která může způsobovat závažné kardiovaskulární problémy [13]. Lidská forma tohoto enzymu obsahuje ve své struktuře mimo jiné hem. Naváže-li se na hem molekula oxidu dusnatého či uhelnatého, dochází k inhibici cystathion- β -synthasy. Při oxidaci iontu železa v hemu z oxidačního čísla II na oxidační číslo III dochází k přibližně dvojnásobnému zvýšení enzymové aktivity [6].

2.3 Senzorové proteiny detekující hem

Syntéza hemu probíhá v mitochondriích a cytosolu, hem se ovšem vyskytuje v celé buňce [6,8]. Výchozími látkami pro jeho biosyntézu jsou sukcinyl-CoA a glycin. Nejdůležitější enzym regulující biosyntézu hemu se nazývá ALA-synthasa katalyzující vznik δ -aminolevulové kyseliny ze sukcinyl-CoA a glycinu v mitochondriích [8]. Koncentrace volného hemu překračující hodnotu $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je pro buňku toxická, a proto je pro ni nezbytné mít velmi komplexní aparát pro regulaci této koncentrace. V opačném případě by mohlo docházet k produkci reaktivních forem kyslíku, což představuje pro buněčný aparát vysokou zátěž vlivem oxidativního stresu. Druhým významným důvodem pro regulaci koncentrace volného hemu v buňce je efektivní využití železa (respektive iontů železa) v organismu. Jak již bylo uvedeno dříve, hem obsahuje ve své struktuře ion železa. Příjem tohoto prvku především u savců pokrývá nedostatečně požadavky železa v organismu. Proto je pro tyto organismy nezbytností mít dokonale vyvinutý systém pro recyklaci železa. Z tohoto důvodu je výskyt nadbytku nevyužitého volného hemu, a tedy i nevyužitého železa, zcela nežádoucí [14]. Degradaci hemu, jejíž počáteční fáze probíhá v mikrosomálním enzymovém systému hemoxygenasy, vzniká bilirubin [8].

Senzorové proteiny detekující hem mají vysokou citlivost právě pro změny koncentrace volného hemu v buňce a dle jejich konkrétní funkce jsou schopny na jeho vysokou, případně nízkou koncentraci příslušně reagovat [6].

Senzorové proteiny detekující hem obsahují minimálně dvě domény. Jedná se o senzorovou doménu zodpovědnou za detekci volného hemu a funkční doménu vykazující buď enzymovou aktivitu, nebo schopnost vazby na DNA, v případě, že daný senzorový protein působí jako transkripční faktor. Vazba hemu na senzorovou doménu či disociace hemu z ní, představující primární signál, způsobí strukturní změnu této domény. Strukturní změna senzorové domény vyvolá tzv. sekundární signál, jenž je přenesen do funkční domény. Na základě tohoto signálu dochází k indukci či represii samotné aktivity popisovaných proteinů. Tímto způsobem je zajištěn velice sofistikovaný systém reagující na dostupnost volného hemu v buňce [6]. Graficky znázorňuje výše zmiňovaný mechanismus obrázek 3.



Obrázek 3. Mechanismus působení hemu jako signální molekuly na senzorové proteiny detekující hem, převzato z [7] a upraveno.

2.3.1 Význam thiolátové skupiny cysteinu v senzorové doméně

Senzorová doména senzorových proteinů detekujících hem je schopna reverzibilně vázat hem prostřednictvím jeho centrálního iontu železa. Tato interakce je většinou zprostředkována thiolátovou skupinou cysteinu vystupující jako axiální ligand při vazbě hemu [7]. Vhodnost právě této skupiny spočívá v ideální síle vazby mezi ní a iontem železa v hemu. Zmíněná vazba nesmí být příliš silná, a právě tato její vlastnost umožňuje senzorovým proteinům detekujícím hem reagovat jak na přebytek, tak na nedostatek hemu jeho navázáním na thiolátovou skupinu cysteinu, respektive jeho disociací z ní. Pevnost vazby iontu železa s thiolátovou skupinou cysteinu klesá při redukci železitého iontu na ion železnatý [6].

2.3.2 CP motiv

Jedná se o strukturní motiv tvořený aminokyselinami cysteinem a prolinem, které spolu sousedí v polypeptidovém řetězci [15]. Tento motiv je také označován termínem hemový regulační motiv. Thiolátová skupina cysteinu v něm slouží jako vazebné místo pro hem a umožňuje tak jeho detekci v senzorové doméně [6]. Význam sousedního zbytku prolinu spočívá v optimálním nastavení síly interakce thiolátové skupiny cysteinu s hemovým iontem železa [16,17]. Prolinový zbytek totiž snižuje flexibilitu postranního řetězce cysteinu a zároveň vyvolává oddálení tohoto řetězce od povrchu proteinu. Bylo experimentálně prokázáno, že při mutaci prolinového zbytku v CP motivu ztrácí tento motiv schopnost vázat, a tedy i detekovat hem. Tak jako umožňuje CP motiv snadnou vazbu hemu na senzorovou

doménu, usnadňuje také jeho disociaci z této domény. Ta nastává při redukci železitého iontu v hemu na ion železnatý (viz kapitola 2.3.4) [7].

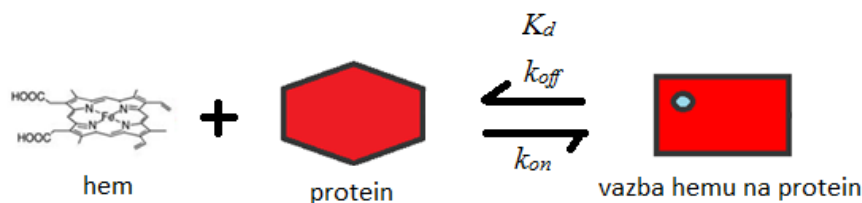
Nedávné výzkumy prokázaly, že ne každý CP motiv vyskytující se v senzorové doméně je schopen vázat molekulu hemu. Na druhou stranu byla také objevena řada senzorových proteinů detekujících hem, které nemají ve struktuře senzorové domény žádný CP motiv, a přesto jsou tyto proteiny schopny reverzibilně hem vázat a reagovat na změnu v jeho koncentraci [6]. Pouze na základě přítomnosti či nepřítomnosti CP motivu tedy nelze jednoznačně prokázat, respektive vyvrátit, příslušnost proteinu ke skupině senzorových proteinů detekujících hem.

2.3.3 Disociační konstanta a rychlostní konstanty hemu

Skutečností, že v senzorových proteinech detekujících hem je vazba hemu na senzorovou doménu relativně slabá, odpovídají i hodnoty rychlostní konstanty disociace hemu, k_{off} . Tyto hodnoty pro typické senzorové proteiny detekující hem jsou asi o tři až čtyři řády vyšší než u ostatních nesenzorových hemoproteinů. Popisované rozdíly jsou patrné z obrázku 4 (strana 19) a tabulky 1 [7]. V tabulce 1 je uvedeno srovnání příslušných konstant proteinů inhibitoru proteosyntézy, který je regulovaný hemem (HRI), a neuronálního PAS proteinu 2 (NPAS2), jakožto zástupců senzorových proteinů detekujících hem, a lidského hemoglobinu (huHb), jakožto zástupce nesenzorových hemových proteinů. Rychlostní konstanty pro navázání hemu, k_{on} , na příslušné proteiny jsou pro všechny hemoproteiny řádově srovnatelné. Důsledkem je tedy to, že rovnovážná disociační konstanta hemu, K_d , nabývá pro senzorové proteiny detekující hem o již zmíněné tři až čtyři řády vyšších hodnot.

Tabulka 1. Rychlostní konstanty navázání a disociace hemu pro uvedené proteiny a rovnovážná disociační konstanta hemu v těchto proteinech (vlastní zpracování).

protein	k_{on} (mol ⁻¹ .dm ³ .s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_d (mol.dm ⁻³)	zdroj
HRI	$1.1 \cdot 10^7$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-10}$	[18]
NPAS2	$3.3 \cdot 10^7$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-10}$	[19]
huHb	$2.9 \cdot 10^7$	$7.1 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-13}$	[20,21]



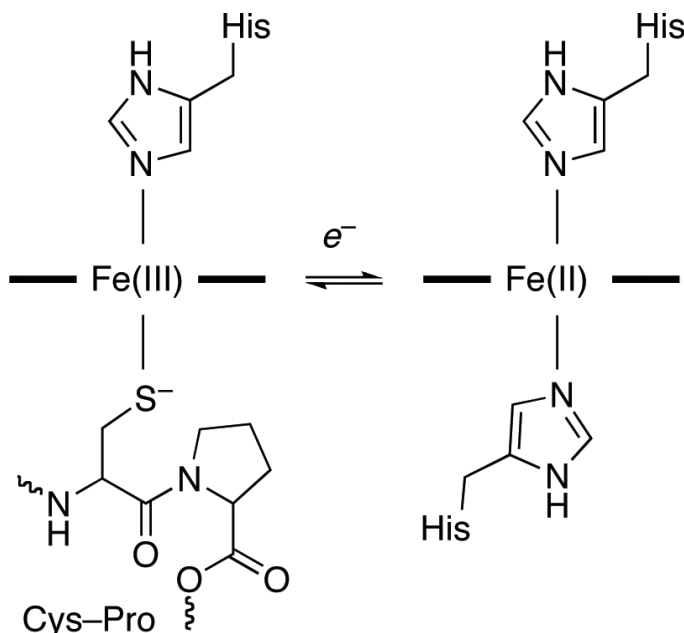
Obrázek 4. Grafické znázornění významu příslušných konstant použitých v textu (vlastní zpracování).

Dosud naměřená data u dalších sensorových proteinů detekujících hem odpovídají zde popisovanému trendu. Je tedy zřejmé, že relativně slabá vazba hemu na tyto proteiny je žádoucí pro jejich funkci jakožto detektorů hemu. Tato vlastnost poskytuje popisovaným proteinům senzibilitu na změny koncentrace hemu v buňce. Při nedostatku hemu se jeho molekula neváže na sensorovou doménu. Díky tomu může být hem využit buňkou, která jej v dané chvíli postrádá. Při nadbytku hemu se naopak jeho molekula navzdory slabé interakci váže na sensorovou doménu. Dle konkrétního zástupce představuje vazba hemu na sensorovou doménu, respektive disociace z ní, primární signál, jenž se přenáší na funkční doménu. Sensorové proteiny detekující hem jsou tedy citlivé až na jistou nadprahovou koncentraci této molekuly v buňce [6].

2.3.4 Záměna ligandů hemu v závislosti na redoxním stavu iontu železa v hemu

Záměna ligandů hemu v závislosti na redoxním stavu iontu železa v hemu je jedním z mechanismů, kterým jsou některé sensorové hemoproteiny schopny reagovat na redoxní stav v buňce. Nachází-li se ion železa v hemu v oxidačním čísle III, dochází zpravidla k jeho vazbě na thiolátovou skupinu cysteinu v sensorové doméně. Změnou okolních podmínek může dojít k redukci iontu železa na oxidační číslo II [6]. Tuto redukci může doprovázet záměna thiolátové skupiny cysteinu za jiný, pro toto oxidační číslo výhodnější ligand. Typickým příkladem takového ligandu je například imidazolová skupina histidinu (viz obrázek 5, strana 20). Snadná disociace iontu železa v oxidačním čísle II je umožněna díky poměrně silně aniontovému charakteru thiolátové skupiny. Popisovaný proces se v literatuře obvykle označuje jako záměna ligandů a umožňuje sensorovým proteinům citlivost na oxidoredukční stres. Tato citlivost spočívá ve strukturních změnách sensorové domény, které jsou způsobeny právě procesem záměny ligandů, a v přenosu signálu do funkční domény [7]. Příkladem sensorového proteinu detekujícího hem, u něhož je

předpokládána záměna ligandů v závislosti na oxidačním čísle železa v hemu, je transkripční represor Fur (název pochází z anglického „ferric uptake regulator“) [22].



Obrázek 5. Záměna ligandů v závislosti na oxidačním čísle iontu železa v hemu. K tomuto procesu dochází například u proteinu Fur. Převzato z [6].

2.3.5 Flexibilita

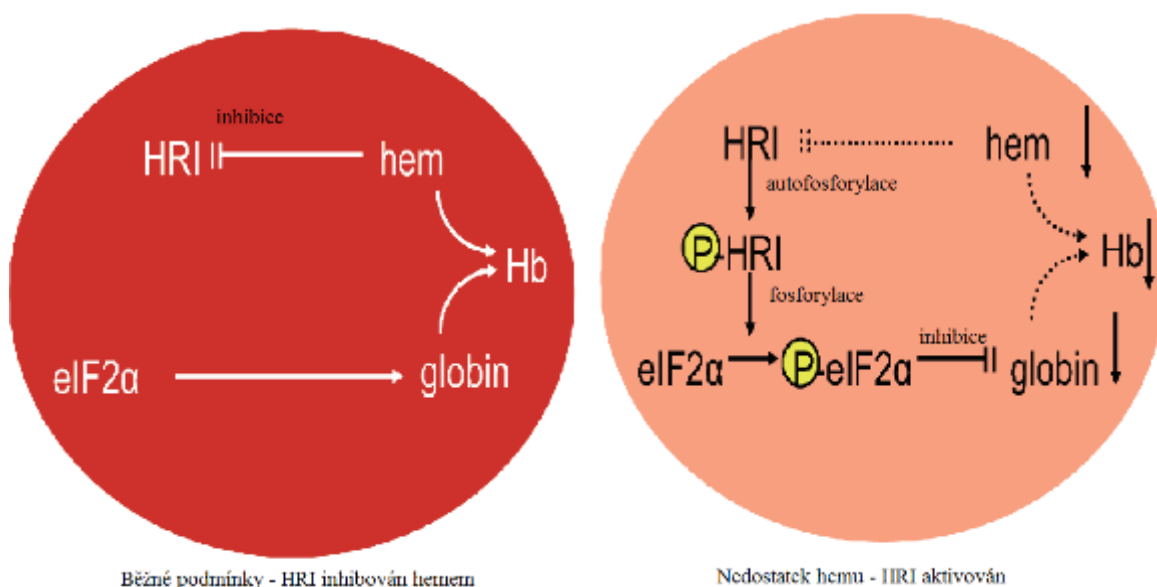
Senzorové proteiny detekující hem mají mnohem flexibilnější strukturu v porovnání s „klasickými“ hemovými proteiny [7,23]. Toto tvrzení bylo experimentálně prokázáno s využitím mutací axiálních ligandů hemu. Tyto mutace mnohdy nezpůsobily změnu absorpčních spekter proteinů [23,24]. Díky flexibilitě popisovaných proteinů došlo po mutaci axiálního ligandu k jeho rychlé náhradě za postranní řetězec jiné blízké aminokyseliny. V těchto případech bylo potřeba provést až tři mutace, aby senzorové proteiny detekující hem ztratily schopnost vázat hem a působit tak jako detektory změny jeho koncentrace [6].

2.3.6 Inhibitor proteosyntézy, který je regulovaný hemem (HRI)

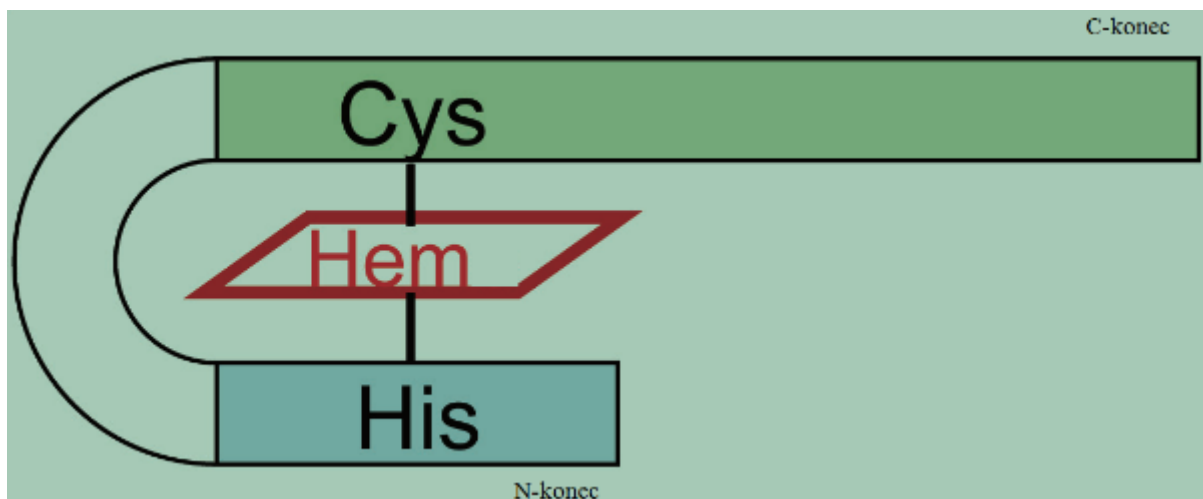
Jedná se o jednoho z nejlépe prozkoumaných zástupců senzorových proteinů detekujících hem. Tento protein patří do rodiny eIF2α kinas a hlavním místem jeho působení jsou retikulocyty. HRI v aktivní formě fosforyluje hydroxylovou skupinu serinu v poloze 51 eukaryotického iniciačního faktoru 2α (eIF2α), což v důsledku vede k zastavení translace, a tedy i syntézy globinu v retikulocytech. Aktivita HRI, jakožto senzorového proteinu

detekujícího hemu, je ovlivněna dostupností hemu. Je-li v retikulocytech dostatečné množství hemu, váže se jeho molekula na HRI, což vede k zablokování kinasové aktivity tohoto proteinu. Za tohoto stavu je tedy umožněna syntéza globinu a následně hemoglobinu. Některé nemoci jako erytropoetická protoporfyrie nebo β -thalasemie mohou způsobit stav, kdy je v retikulocytech nedostatek hemu. Nedostatek hemu je pro buňku stresující faktor, podobně jako nadbytek této molekuly. Při nedostatku hemu tedy dochází v retikulocytech ke stresové situaci, se kterou se musejí vyrovnat. Jedním z obranných mechanismů je i zastavení translace globinu, čemuž výrazně napomáhá právě HRI. Nedostatek hemu způsobí jeho disociaci z HRI. Tato disociace aktivuje nejprve autofosforylaci a následně kinasovou aktivitu HRI. Výsledkem je zastavení translace globinu [6]. Tento proces graficky znázorňuje obrázek 6. Z uvedeného mechanismu vyplývá, že hlavní funkcí HRI je udržení molárního poměru hemu a globinu 1:1 v závislosti na koncentraci hemu v retikulocyту [6].

Axiálními ligandy železa v hemu jsou v proteinu HRI thiolátová skupina cysteinu nacházející se na C-koncové senzorové doméně a imidazolová skupina histidinu nacházející se na N-koncové kinasové doméně. Navázáním hemu na HRI tedy dochází k interakci obou domén, což má za následek velké strukturní změny celého proteinu [6]. Schematické znázornění tohoto mechanismu detekce hemu vystihuje obrázek 7 (strana 22).



Obrázek 6. Mechanismus působení HRI v retikulocytech, převzato z [6] a upraveno.



Obrázek 7. Schéma mechanismu detekce hemu v HRI, převzato z [6] a upraveno.

2.3.7 Neuronální PAS protein 2 (NPAS2)

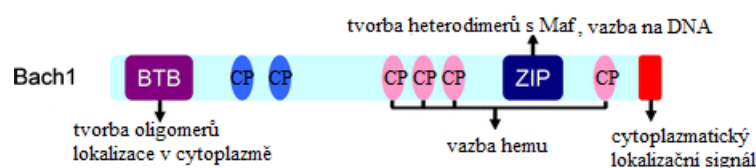
Jedná se o senzorový protein detekující hem, jehož funkční doména na základě dostupnosti hemu ovlivňuje transkripci. Hlavním místem jeho působení je přední mozek [25-27]. Tvoří heterodimer s proteinem BMAL1 a jeho vazbou na specifický úsek DNA usnadňuje transkripci genů, které mají důležitou roli při řízení cirkadiálních rytmy [25]. Cirkadiální rytmy jsou významné biologické rytmy s periodou přibližně 24 hodin. Během této doby dochází k transkripci několika specifických genů, jejichž proteinové produkty následně pomocí negativní zpětné vazby příslušné transkripční děje inhibují. Cirkadiální rytmy výrazně ovlivňují hladiny mnoha hormonů v krvi živočichů (u člověka např. melatonin, aldosteron či kortizol). Tento mechanismus řídí aktivitu živočichů v závislosti na denní době [28].

Mezi zástupce senzorových proteinů detekujících hem patří také protein Bach1, který byl v rámci této bakalářské práce studován. Proto je jeho charakteristika popsána v následující samostatné kapitole.

2.4 Bach1

Bach1 je senzorový protein detekující hem, jehož hlavní funkcí je regulace transkripce genů v závislosti na změnách koncentrace hemu v buňce. Pojmenování Bach1 je odvozeno z názvu jeho významné domény (BTB doména, z anglického pojmenování „**B**road complex – **T**ramtrack – **B**rick – a - **b**rack domain“) a názvu rodiny transkripčních faktorů, do které tento protein patří (z anglického pojmenování „Cap’n’Collar“ rodina – CNC) [29]. Kompletní

název tohoto proteinu tedy zní **BTB a CNC homolog 1 (Bach1)** [30]. Poprvé byl Bach1 popsán v roce 1996 japonskými vědci jako nově objevený transkripční faktor interagující se svalovoaponeurotickým fibrosarkomovým proteinem K (MafK) [31]. Myší forma Bach1 je tvořena 739 aminokyselinami o celkové molekulové hmotnosti 81.374 kDa [30]. Aminokyselinová sekvence lidského Bach1 o délce 736 aminokyselin vykazuje 88% shodu s myším homologem [32]. Bach1 se nachází především v jádře a cytoplazmě hematopoetických buněk [33]. Na N-konci tohoto proteinu se vyskytuje BTB doména umožňující tvorbu oligomerů s jinými proteiny. Tato doména je také částečně zodpovědná za lokalizaci proteinu Bach1 v buňce [34]. Oblast, na kterou se váže hem, se nachází blíže k C-konci Bach1 a obsahuje celkem čtyři CP-motivy. Na C-konci se nachází také doména obsahující motivy bazických leucinových zipů zodpovědná za vazbu Bach1 na DNA a tvorbu heterodimerů s proteinem MafK [35]. Jak bude ale dále vysvětleno, zdá se, že samotný protein Bach1 se nedokáže vázat na DNA s dostatečnou silou. Bach1 obsahuje také cytoplazmatický lokalizační signál zodpovědný za jaderný export a lokalizaci Bach1 v rámci cytoplazmy [36]. Všechny významné komponenty struktury Bach1 znázorňuje obrázek 8.



Obrázek 8. Schematické znázornění struktury proteinu Bach1, převzato z [29] a upraveno.

Hlavní funkcí proteinu Bach1 na molekulární úrovni je regulace transkripce genů pro hemoxygenasu-1 (HO-1). Tato regulace je uskutečňována prostřednictvím tvorby heterodimerů s proteinem MafK a následnou vazbou heterodimerů na specifickou oblast DNA. Zmiňovanou oblast nazýváme Maf rozpoznávací oblast (z anglického označení „**Maf** recognition element“ - MARE) [35]. MafK patří mezi proteiny rodiny Maf. Jedná se o proteiny několikanásobně menší než Bach1. Jejich sekvence je tvořena zpravidla asi 160 aminokyselinami o celkové molekulové hmotnosti okolo 18 kDa. Maf proteiny jsou transkripční faktory, které také obsahují ve své struktuře bazické oblasti leucinových zipů. Tvorba heterodimerů MafK-Bach1 je obligatorní pro správnou funkci Bach1. Samotný Bach1 nemá schopnost se pevně navázat na MARE oblast DNA [37].

Při nízkých koncentracích volného hemu v buňce dochází k vazbě heterodimeru MafK-Bach1 na oblast MARE. Za tohoto stavu je inhibována transkripce genů pro HO-1. Bach1 tedy působí jako inhibitor transkripce. Při zvýšení koncentrace volného hemu v buňce dochází k jeho vazbě na Bach1 prostřednictvím CP-motivů na C-konci. Tato vazba způsobí disociaci heterodimeru MafK-Bach1 z MARE, čímž je zrušen inhibiční efekt Bach1. Dochází k expresi enzymu HO-1, který katalyzuje odbourávání nadbytečného hemu. Popisovaný proces umožňuje buňce udržovat optimální koncentraci volného hemu a nepřipustit jeho kumulaci, která by měla za následek mimo jiné zvýšené riziko oxidativního stresu [29].

Pro vazbu hemu na Bach1 jsou klíčové CP-motivy. Bach1 obsahuje šest těchto motivů. Pomocí titračních experimentů, které využily kolekci molekul Bach1 s různě modifikovanými CP motivy, bylo prokázáno, že dva CP-motivy nacházející se blíže N-konci (nazývány CP-1 a CP-2) nemají schopnost vázat hem. CP-motivy na C-konci Bach1 (nazývány CP-3 až CP-6) mají schopnost hem vázat, nicméně identifikace konkrétních motivů účastnících se takové vazby je velmi obtížná [38]. Závěry studií [35,38] se různí v počtu molekul hemu, které je schopen Bach1 vázat. Experimenty využívající hemin značený izotopem ^{55}Fe vedou k domněnce, že Bach1 obsahuje pouze asi jedno vazebné místo pro hem (na 1 mol Bach1 se váže asi 1.3 mol heminu) [35]. Závěry experimentů využívajících titraci hemem se spektroskopickým vyhodnocením poukazují na existenci až pěti míst vázajících hem [38]. Vysvětlení těchto rozdílů a odhalení skutečného počtu míst pro vazbu hemu v Bach1 stále zbývá objasnit a v současné době se na tomto problému intenzivně pracuje.

Při nízkých koncentracích hemu se Bach1 nachází převážně v jádře, kde působí jako inhibitor transkripce. V případě zvýšené koncentrace volného hemu v buňce dochází k exportu Bach1 z jádra. Za tento export jsou zodpovědné CP-motivy CP-3 až CP-6. Pravděpodobně se jedná o obranný mechanismus buňky, která se tak brání před inhibičním efektem Bach1. Popisovaný mechanismus probíhá i opačným směrem, nicméně detaily o tomto mechanismu nejsou zatím známy. V případě inhibice syntézy hemu dochází k akumulaci Bach1 v jádře [36].

Mechanismus působení Bach1 na molekulární úrovni ovlivňuje systémové funkce tohoto proteinu v rámci celého organismu [34]. Tento protein participuje například na regulaci metabolismu železa v organismu. Železo má v podobě svých iontů nezastupitelný význam jako součást kofaktoru hemu, který je nezbytnou součástí hemoglobinu v červených krvinkách. Na druhou stranu je tento prvek také velmi reaktivní. Je schopen v organismu způsobit produkci reaktivních forem kyslíku procesem zvaným Fentonova reakce [39]. Jednotlivé buňky se před takto způsobeným oxidativním stresem brání mnoha způsoby.

Jedním z nich je i využití regulace transkripce genů pro HO-1 prostřednictvím Bach1. Tím se Bach1 stává jedním z potenciálních míst terapeutického zásahu při léčbě nemocí souvisejících s oxidativním stresem. Tento protein se účastní také regulace krvevotvorby, procesu nemocí kardiovaskulárního systému či urychluje regeneraci střevní mukózy. Jedná se mimo jiné také o významnou regulační molekulu imunitního systému. Konkrétně Bach1 participuje na vývoji makrofágů a dendritických buněk. V důsledku toho je spojován s vývojem autoimunitních chorob [34]. Bach1 má v organismu mnoho funkcí a dosud pravděpodobně nebyly všechny zcela odhaleny a popsány.

2.5 Elektromigrační metody

Tyto techniky využívají elektrické pole k pohybu a separaci nabitých komponent vzorku. Pohyb částic v důsledku působení elektrického pole se nazývá migrace. Rychlost a směr pohybu příslušné částice závisí kromě vlastností prostředí především na jejím náboji a rozměrech. Částice lišící se těmito parametry migrují v elektrickém poli rozdílnou rychlostí, což umožňuje jejich separaci [40].

2.5.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

Tato metoda umožňuje separaci molekul dle molekulové hmotnosti. Velké molekuly obtížněji pronikají gelem, což způsobuje zpomalení jejich pohybu. V biochemii je tato metoda využívána především pro separaci proteinů [4].

Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály. Jako zdroj těchto radikálů se využívá peroxodisíran amonný. Do směsi pro přípravu gelu se dále přidává stabilizátor volných radikálů N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) a vše je nutno smíchat ve vhodném množství pufru. Celkový podíl polyakrylamidu a stupeň jeho zesíťování ovlivňují velikost pórů v gelu. Při diskontinuálním způsobu provedení SDS-PAGE je využíváno dvou různých gelů. Jedná se o gel zaostřovací a separační, které mají odlišnou velikost pórů. Výhodou tohoto způsobu provedení je výrazné snížení rozmývání zón separovaných látek, a tedy zvýšení stupně rozlišení jednotlivých zón [4].

Dodecylsírany sodný (SDS) je detergent pevně se vážající k proteinům. Dochází tím k jejich denaturaci. V průměru se váže jedna molekula SDS na dvě peptidové vazby. Jelikož každá molekula SDS nese jednotkový záporný náboj, převyší velké množství těchto molekul vázaných na proteiny nábojový příspěvek funkčních skupin jednotlivých aminokyselin.

Všechny molekuly proteinů interagující s SDS jsou záporně nabitě a v elektrickém poli migrují stejným směrem. Poměr mezi velikostí náboje a molekulovou hmotností je tedy u všech SDS-proteinů v poměru asi 1:1. Díky tomu je rychlost migrace molekul proteinů dána výhradně jejich molekulovou hmotností, na jejímž základě se jednotlivé molekuly separují [8].

Pruhy elektroforeticky rozdělených látek lze na elektroforetickém gelu zviditelnit mnoha technikami. Běžně se pro barvení proteinů využívá ponoření gelu do kyselého roztoku obsahujícího alkohol a barvivo Coomassie brilliant blue. Pruhy se zviditelní díky vzniku komplexů protein-barvivo. Přebytek barviva lze odstranit omýváním gelu kyselým roztokem. Identifikace pruhů se provádí na základě srovnávání polohy pruhů se standardy [4].

2.5.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosa je polymer tvořený opakujícími se jednotkami disacharidu tvořeného D-galaktosou a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosou [41]. Agarosový gel obsahuje větší póry než gel polyakrylamidový, což umožňuje separaci látek s velkou molekulovou hmotností.

Elektroforéza v agarosovém gelu je běžně využívána k separaci nukleových kyselin [4]. Molekuly DNA mají díky fosfátovým skupinám záporný náboj, putují tedy v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě. S rostoucí délkou řetězce DNA roste i její záporný náboj. Díky tomu lze její molekuly separovat v agarosovém gelu dle molekulové hmotnosti. Migrace molekul DNA v agarosovém gelu je determinována mnoha faktory, které zahrnují velikost a konformaci molekul DNA, koncentraci agarosy v gelu či typ elektrodového pufru [42].

Při provádění agarosové elektroforézy se běžně využívá TAE pufr. Jedná se o směs Tris(hydroxymethyl)aminomethan-acetátu (Tris-acetátu) a kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Jako barvivo se využívá ethydiumbromid, který interkaluje do struktury DNA. Zviditelnění pruhů DNA je pak umožněno pomocí ultrafialového záření. Toto záření způsobí excitaci delokalizovaných elektronů aromatického kruhu ethydiumbromidu. Excitované elektrony se vracejí do základního energetického stavu vyzářením přebytečné energie, kterou můžeme pozorovat jako světlo [42].

2.6 Chromatografické metody

Chromatografické metody využívají k separaci látek jejich rozdílnou interakci se sloupcem pórovitého materiálu, tzv. stacionární fází. Na pórovitý materiál může být navázána kapalina či vhodná funkční skupina. Separované látky jsou většinou rozpuštěny v kapalině

či plynu, které tvoří mobilní fázi. Při putování v mobilní fázi přichází látky do kontaktu se stacionární fází. Interakce se stacionární fází či pronikání do jejích pórů způsobuje retardaci molekul a rozdělení do zón jednotlivých látek, které lze vhodným způsobem detekovat [4].

2.6.1 Gelová filtrace

Tato metoda umožňuje rozdělení molekul dle jejich velikosti a tvaru. Jako stacionární fáze se využívá hydratovaná porézní látka ve formě kuliček. Při průchodu různě velkých molekul dochází k jejich separaci. Menší molekuly mají schopnost pronikat do pórů stacionární fáze, čímž dochází k jejich retardaci. Větší molekuly se do pórů nedostávají a putují rychleji směrem k detektoru. Eluční objem dané látky je definován jako objem mobilní fáze nutný pro vymytí látky z kolony. Kromě typu stacionární fáze a velikosti molekul má na eluční objem vliv do jisté míry také jejich tvar. Nejsnadněji pronikají do pórů kulovité molekuly [4].

Gelová filtrace se využívá především pro separaci látek na základě jejich molekulové hmotnosti. Tato metoda umožňuje separaci proteinů vyskytujících se v roztoku v přirozených oligomerních stavech. Proteiny tedy není potřeba před separací denaturovat. Tím se tato metoda liší od metody SDS-PAGE, která separuje pouze denaturované proteiny, které navíc také pozbyly své oligomerní struktury.

Nejdříve eluují z kolony látky o nejvyšší molekulové hmotnosti, s rostoucím elučním objemem eluují látky o nižších molekulových hmotnostech. Gelovou filtrací lze také stanovit molekulovou hmotnost neznámé látky. V takovém případě se využívá srovnání elučního objemu stanovované látky a elučních objemů látek o známé molekulové hmotnosti [4].

2.6.2 Afinitní chromatografie

Při této metodě se na stacionární fázi váže kovalentně určitý ligand. Tento ligand vytváří specifickou vazbu s určitou separovanou látkou, například proteinem. Průchodem směsí proteinů a dalších látek přes stacionární fázi dojde k navázání proteinu na ligand. Následuje eluce nejprve nízkými koncentracemi vhodného činidla, která umožní vymytí látek nespecificky vázaných na ligand. Po vymytí těchto interferentů probíhá eluce separovaného proteinu pomocí vysokých koncentrací elučního činidla. Toto činidlo zpravidla obsahuje molekuly s afinitou k ligandu. Vlivem jejich vysoké koncentrace dojde k uvolnění separovaného proteinu. Podobnou funkci jako ligand může mít i ion kovu [4].

Afinitní chromatografie se využívá například při separaci proteinů, které mají na C-konci nebo N-konci tzv. histidinovou kotvu. Jedná se o sekvenci několika za sebou

jdoucích histidinů. Imidazolové skupiny histidinů mají afinitu k iontům přechodných kovů (např. kobaltnatým), které jsou vázány ve struktuře stacionární fáze. Jako eluční činidlo vystupuje v tomto případě imidazol [43].

2.7 Metody molekulární biologie

2.7.1 Izolace nukleových kyselin

Pro izolaci DNA z buněk je potřeba zbavit se lyzátů, které by bránily další práci s DNA. Výchozím materiálem jsou u prokaryotických organismů jednotlivé buňky. Prvním krokem izolace je rozrušení buněčných stěn působením detergentů a enzymů. Působením vhodných činidel poté dochází k denaturaci proteinů. Centrifugací lze získat rozpuštěnou DNA, kterou je možno vysrážet například ethanolem. Vzniklá sraženina DNA je následně separována centrifugací a pro další využití lze tuto sraženinu rozpustit ve vhodném rozpouštědle [44].

2.7.2 Štěpení řetězců DNA

Pro štěpení řetězců DNA na specifických místech lze využít restriční endonukleasy. Jejich fyziologický význam spočívá v odbourávání cizorodé DNA. Každá restriční endonukleasa rozpoznává pro ni specifickou sekvenci. Jedná se o sekvenci čtyř až sedmi nukleotidů, která má běžně palindromatický charakter. Produkty působení těchto endonukleas jsou restriční fragmenty DNA o definované délce [44]. Restriční fragmenty mohou obsahovat tzv. „lepivé“ konce, které mají velký význam při konstrukci hybridních molekul DNA [8].

2.7.3 Amplifikace DNA

Jedná se o produkci velkého množství stejných molekul DNA. Tyto molekuly jsou zpravidla umístěny do klonovacích vektorů. Bakteriální plazmidy se běžně využívají jako klonovací vektory. Jedná se o malé cyklické dvouřetězcové molekuly DNA. Mohou buňce poskytovat rezistenci na antibiotika. Díky své malé velikosti jsou plazmidy snadno separovatelné. Znalost přesné sekvence plazmidů umožňuje do nich vkládat molekuly DNA s využitím restričních endonukleas. Cíleným přenosem plazmidů do bakteriálních buněk (transformací) lze amplifikovat plazmidovou DNA [8].

2.7.4 Sekvenování DNA

Jedná se o stanovení přesné nukleotidové sekvence příslušné DNA. Pro tyto účely je nutno mít velký počet identických molekul DNA, jejíž nukleotidová sekvence nás zajímá.

Enzymová metoda sekvenování využívá specifické dideoxynukleotidy, které po zařazení do nově vznikajícího vlákna DNA zastavují jeho syntézu. Sekvenovaná molekula DNA je templátem pro popisovanou syntézu. Tímto způsobem vznikají různě dlouhé fragmenty končící vždy dideoxynukleotidem. Při vhodné optimalizaci sekvenování lze získat molekuly DNA lišící se vzájemně délkou o jeden nukleotid. Separací a vizualizací jednotlivých fragmentů lze přečíst celou sekvenci DNA [8].

2.7.5 Polymerasová řetězová reakce

Podstatou polymerasové řetězové reakce (PCR) je opakovaná enzymová syntéza nových řetězců DNA dle zvolených úseků dvouřetězcové DNA. Dochází k ní připojením dvou krátkých syntetických oligonukleotidů komplementárních k vybrané sekvenci, tzv. „primerů“, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3'-OH konce směřovaly proti sobě. Po přidavku DNA-polymerasy a nukleotidů probíhá syntéza na obou templátových řetězcích protisměrně. Pro PCR je nutno použít termostabilní DNA-polymerasu, což umožní cyklický průběh syntézy DNA. V průběhu cyklu dochází ke změnám teploty reakční směsi. Jeden cyklus PCR zahrnuje denaturaci dvouřetězcových molekul DNA, připojení „primerů“ k jednotlivým řetězcům DNA a samotnou polymerační reakci. Délku jednotlivých kroků a použitou teplotu při nich je třeba optimalizovat dle délky amplifikovaného úseku DNA a sekvence „primerů“. PCR se provádí v zařízení zvaném termocykler umožňujícím automatické změny teploty v naprogramovaných časových intervalech [44].

3 Cíle bakalářské práce

Pro předkládanou bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

- Ověřit, zda spolupracující laboratoří (laboratoř profesora Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan) poskytnutý plazmid je vhodný pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- V případě, že by se poskytnutý plazmid jevil jako nevhodný pro další experimenty, připravit plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag vhodný pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- Transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) plazmidem pET-21c(+)/Bach1-Histag a exprimovat v nich protein Bach1.
- Izolovat protein Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3) a následně tento protein purifikovat v jeho „apoformě“ a „holoformě“.
- Předběžně charakterizovat izolovaný a purifikovaný protein Bach1 v jeho „apoformě“ a „holoformě“.

4 Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD
Autokláv:	Varioklav 400E, H+P Labortechnik GmbH Microjet, Enbio Technology
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Centrifuga:	5415 R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter Janetzki K 70 D, MLW Gilson, GmC Lab
Čtečka 96 jamkových destiček:	Infinite M200 PRO, Tecan
Elektroforetická aparatura:	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio Rad MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec
Inkubátor:	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator, Flow Laboratories Raven 2, LTE Scientific Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science
Kolona pro gelovou chromatografii:	Superdex 200 Increase 10/300 GL
Laminární box:	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka:	KMO2 basic, IKA
Orbitální míchač:	G 24 New Brunswick Scientific Infors HT Multitron Pro
Předvážky:	Kern 440-35N
Spektrofotometr:	DS-11 Spectrophotometer, DeNovix Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies
Termocykler:	Techne Tech Gene FTGENE2D
Termostat:	LS1, VLM Labortechnik
Transiluminátor:	Dark Reader, Clare Chemical Research
Třepačka:	Mini Rocker MR-1, BioSan

	ZX 3, Velp Scientifica
Ultracentrifuga:	Beckman Optima™ LE-80K
Ultrazvuková sonda:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech
Přístroj pro gelovou chromatografii:	Amersham Biosciences UPC-900

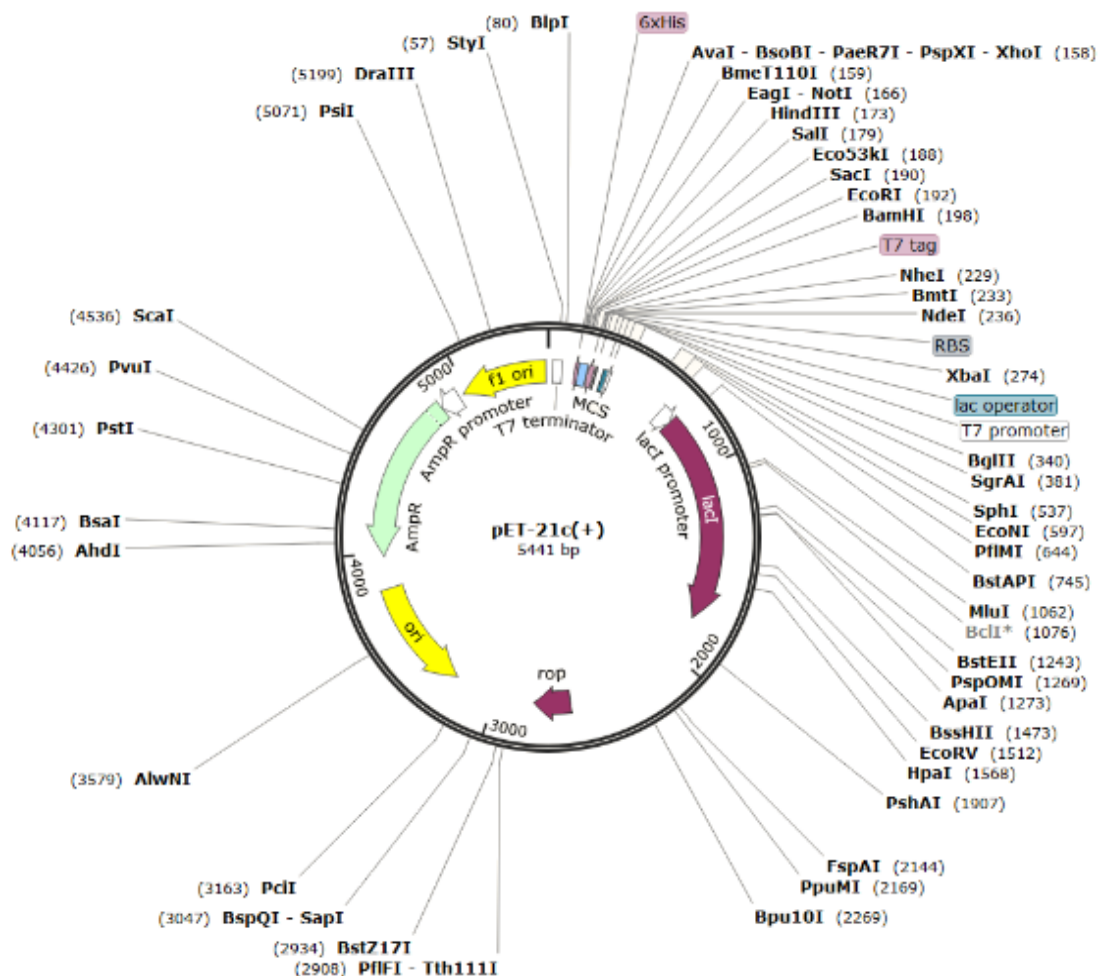
4.2 Použité chemikálie a materiál

Agilent Technologies, USA:	QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit
Bio Tool, Švýcarsko:	Quick-Fusion Cloning Kit
Bio Rad, USA:	Precision Plus Protein™ Standards
Clontech, USA:	TALON® Metal Affinity Resin
Erba Lachema, ČR:	bromfenolová modř, chlorid sodný
Fluka, Švýcarsko:	akrylamid, dodecylsírán sodný (SDS), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), lysosym, 2-merkaptóethanol, N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
INVITROGEN, USA:	SYBR Safe™ DNA Gel Stain
LACHEMA BRNO, ČR:	dihydrogenfosforečnan draselný, ethanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), peroxodisírán amonný
Lach-Ner, ČR:	glycerol, octová kyselina
Linde, ČR:	dusík
NEW ENGLAND BioLabs, USA:	2-log DNA Ladder, <i>Bam</i> HI ,CutSmart pufr, gel loading dye (6x koncentrovaný), <i>Hind</i> III, Monarch® DNA Gel Extraction Kit, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerasa, pufr Phusion® GC, <i>Nde</i> I, NEB4 pufr, <i>Xho</i> I

OXOID LTD, Velká Británie:	tryptone, yeast extract
Penta, ČR:	hydrogenfosforečnan didraselný, glycín
Pharmacia, Švédsko:	agarosa
QIAGEN, Německo:	QIAprep Spin Miniprep Kit
SERVA Elektrophoresis, Německo:	ampicilin, Coomassie Brilliant Blue R-250, N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED),
SIGMA, USA:	dimethylsulfoxid (DMSO), isopropyl β -D-1- -thiogalaktopyranosid (IPTG), Luria Agar, Luria Broth, „forward a reverse primery“
Stratagen, USA:	bakteriální kmeny DH5 α a BL-21(DE3) bakterie <i>E. coli</i>

Plazmid pET-21c(+)

Tento plazmid byl použit pro expresi proteinu Bach1 v prokaryotických buňkách *E. coli*. Plazmid pET-21c(+) obsahuje gen zajišťující rezistenci k antibiotiku ampicilinu. Tato rezistence umožňuje rozlišit buňky, které byly transformovány popisovaným plazmidem. Další důležitou součástí plazmidu pET-21c(+) je T7 promotor. Jedná se o promotor, jenž je specifický výhradně pro T7 RNA polymerasu. Navíc má T7 promotor vysokou afinitu ke zmíněné polymerase, která je mnohonásobně účinnější než běžné bakteriální RNA polymerasy. Pro expresi proteinu Bach1 byly využity buňky *E. coli* BL-21 (DE3) obsahující gen pro T7 RNA polymerasu. Tento gen je kontrolován *lac* operonem. Za běžných podmínek je gen pro T7 RNA polymerasu reprimován. V přítomnosti induktoru (např. isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid, IPTG) dochází k expresi T7 polymerasy. Následně nasedá tato polymerasa na T7 promotor, což umožní masivní expresi genu umístěného bezprostředně za zmíněným promotorem. Plazmid pET-21c(+) obsahuje za T7 promotorem mnoho sekvencí umožňujících štěpení příslušnými restrikčními endonukleasami [45]. Umístění genu pro protein Bach1 těsně za T7 promotor pomocí restrikčních endonukleas *XhoI* a *NdeI* umožní jeho expresi ve zvýšené míře. Navíc dochází k připojení afinitní značky, histidinové kotvy, na C-konec výsledně exprimovaného proteinu Bach1 [46]. Restrikční mapu plazmidu pET-21c(+) znázorňuje obrázek 9 (strana 34).

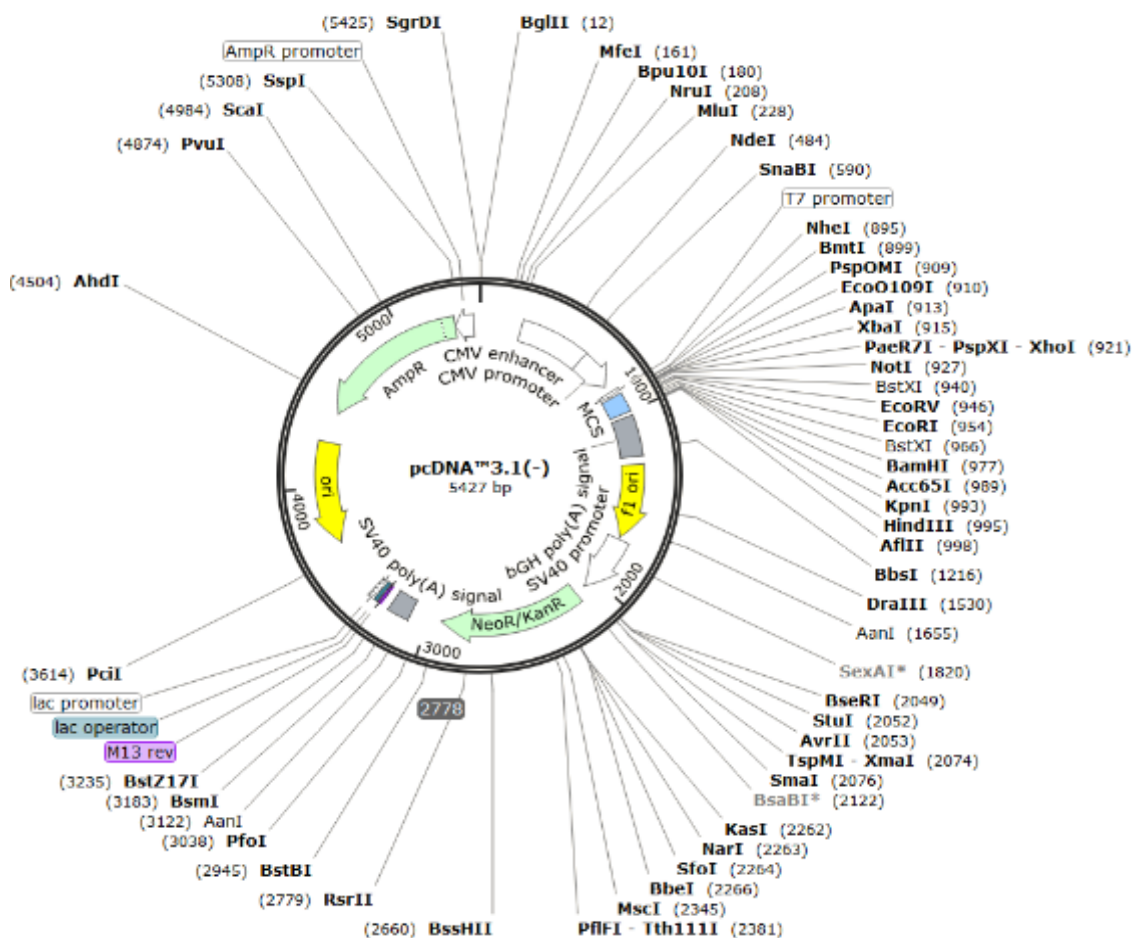


Obrázek 9. Restrikční mapa plazmidu pET-21c(+), převzato z [46].

Plazmid pcDNA3.1(-)

Tento plazmid je primárně určen pro eukaryotickou expresi proteinů. Obsahuje stejně jako pET-21c(+) gen pro rezistenci k ampicilinu a T7 promotor [47]. Gen pro Bach1 byl do něj vložen pomocí restrikčních endonukleas *BamHI* a *HindIII*. V této bakalářské práci byl plazmid pcDNA3.1(-) využit pouze jako zdroj genu pro Bach1. Restrikční mapu tohoto plazmidu znázorňuje obrázek 10 (strana 35).

Plazmidy (plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag a plazmid pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag) byly poskytnuty laboratoří profesora Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan.



Obrázek 10. Restrikční mapa plazmidu pcDNA3.1(-), převzato z [47].

Sekvence tzv. „primerů“ (krátkých syntetických oligonukleotidů komplementárních k vybrané sekvenci) použitých během zpracování bakalářské práce:

- Sekvence „primeru“ pro sekvenaci potřebné části genu vloženého ve vektoru pcDNA3.1(-):

5'-GCGTACACAATATCGAGGAATC-3'

- Sekvence „primeru“ pro sekvenaci střední části genu, která nebyla zjištěna s využitím komerčně dostupných „primerů“ vlivem omezení metody sekvenace:

5'-GCTGTGCAGATTTACACGTG-3'

- Sekvence „forward primeru“ pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.5:

5'-AAGGAGATATACATATGTCTGTGAGTGAGAGTG-3'

- Sekvence „reverse primeru“ pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.5:

5'-GGTGGTGGTGCTCGAGCTCGTCAGTAGTGCACTTG-3'

- Sekvence „forward primeru“ pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.7 (červeně vyznačen mutovaný nukleotid):

5'-GTCAGGGCAGTGTAAGCATCCCCCCTCTCCAGGAC-3'

- Sekvence „reverse primeru“ pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.7 (červeně vyznačen mutovaný nukleotid):

5'-GTCCTGGAGAGGGGGGGATGCTTTTACACTGCCCTGAC-3'

4.3 Použité metody

4.3.1 Izolace plazmidové DNA z filtračního papíru

Plazmidy byly do naší laboratoře zaslány fixované ve vyznačeném kruhu na filtračním papíru. Nejprve bylo třeba plazmidovou DNA z tohoto papíru izolovat. Následující práce byla prováděna v laminárním boxu (BIO 126, Labox). Nůžky a pinzeta byly předem očištěny 70% ethanolem a těsně před použitím sterilizovány v plameni nad kahanem. S filtračním papírem bylo manipulováno výhradně s pomocí pinzety. Z vyznačeného kruhu na filtračním papíru byla vystřižena oblast ve tvaru kruhové výseče. Vystřižená část papíru byla umístěna do mikrozkuhavky Eppendorf obsahující 50 µl EB pufru ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit. Obsah mikrozkuhavky byl krátce protřepán na třepačce (ZX 3, Velp Scientifica), a poté byl ponechán při teplotě 40 °C po dobu 2 hodin (LS1, VLM Labortechnik). V získaném roztoku byla spektrofotometricky stanovena koncentrace plazmidové DNA (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, viz kapitola 0).

4.3.2 Transformace buněk *E. coli* DH5α a *E. coli* BL-21(DE3)

Ve všech experimentech prováděných v rámci této práce byly využity speciálně upravené kompetentní buňky *E. coli* DH5α a *E. coli* BL-21(DE3), které pro transformaci příslušným vektorem nevyžadují teplotní šok (tzv. vysoce účinná transformace plazmidovou DNA). Pro tuto úpravu se v naší laboratoři využívá ZymoBroth médium a souprava Mix and Go od firmy Zymo Research (příprava speciálně upravených kompetentních buněk nebyla v rámci této bakalářské práce prováděna, tyto buňky byly poskytnuty Mgr. Veronikou Fojtíkovou).

Nejprve bylo naváženo 2.5 g Luria Broth média (LB média) a tato navážka byla rozpuštěna ve 100 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl převeden do zásobní láhve. Dále byly naváženy 4 g Luria Agar (LB agar) a toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl převeden do zásobní láhve. Roztoky LB média a LB agar byly sterilizovány působením teploty 121 °C (Microjet, Enbio Technology) po dobu 10 minut.

Připravený sterilní LB agar byl rozpuštěn zahříváním v mikrovlnné troubě a ponechán mírně zchladnout. Následující práce byla prováděna v laminárním boxu (BIO 126, Labox). Do sterilní zkumavky Falcon bylo přelito 20 ml LB agar. Do toho množství bylo přidáno 20 µl zásobního roztoku ampicilinu (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml⁻¹). Obsah zkumavky byl promíchán a přenesen do dvou sterilních Petriho misek (po cca 10 ml). Agar byl krouživými pohyby s Petriho miskami rovnoměrně rozprostřen po celém jejich povrchu. Takto připravené agarové plotny byly ponechány v laminárním boxu při laboratorní teplotě, dokud agar neztuhl.

Buňky *E. coli* byly ponechány rozmraznout na ledu. Dvě sterilní mikrozukavky Eppendorf byly umístěny do laminárního boxu. Do každé mikrozukavky bylo přeneseno 30 µl buněk *E. coli*. Do jedné z těchto mikrozukavek bylo přidáno 0.5 µl plazmidové DNA, druhá mikrozukavka představovala kontrolu. Obě mikrozukavky byly ponechány 15 minut na ledu a poté opět přeneseny do laminárního boxu. K obsahu jednotlivých mikrozukavek bylo přidáno 150 µl LB média. Poté byl obsah mikrozukavek aplikován pomocí automatické pipety na příslušné agarové plotny a rovnoměrně rozprostřen po jejich povrchu. Bylo vyčkáno, dokud se suspenze zcela nevsákla do agaru. Následně byly plotny opatřeny víčkem a uzavřeny parafilmem a umístěny dnem vzhůru do inkubátoru (Raven 2, LTE Scientific). Následovala inkubace při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Po uplynutí příslušné doby byly plotny přeneseny do lednice, dokud nedošlo k jejich dalšímu zpracování.

V laminárním boxu (BIO 126, Labox) bylo do dvou sterilních zkumavek Falcon přeneseno 5 ml LB média a 5 µl ampicilinu a obsah byl promíchán. Dvě kolonie z transformovaných buněk *E. coli* připravených v předchozím kroku byly přeneseny do připravených zkumavek Falcon pomocí plamenem sterilizované pinzety a sterilních dřevěných tyčinek, tzv. „párátek“. Tyto zkumavky byly poté pevně uzavřeny a jejich obsah byl inkubován v orbitálním třepači, tzv. „shakeru“ (G 24 New Brunswick Scientific) při teplotě 37 °C a 220 RPM po dobu 17 hodin. Poté byla pinzetou, předem dezinfikovanou v plameni nad kahanem, vyjmuta „párátka“ ze zkumavek a inkubace byla ukončena centrifugací (Allegro X-22R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C a 4 500 RPM po dobu 10 minut.

4.3.3 Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci amplifikované plazmidové DNA byla využita souprava QIAprep Spin Miniprep Kit. Ze zkumavek Falcon byl odstraněn centrifugací vzniklý supernatant. Po vyschnutí pelety byla tato resuspendována v 250 µl pufru P1 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkušavky Eppendorf. K této suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru P2 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a mikrozkušavka byla šestkrát převrácena. Poté byl obsah mikrozkušavky ponechán tři minuty stát. Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 350 µl pufru N3 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a mikrozkušavka byla desetkrát převrácena. Poté byla provedena centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 10 minut při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf). Získaný supernatant byl přenesen na kolonu mikrozkušavky, která byla součástí používané soupravy pro izolaci plazmidové DNA. Poté byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf). Filtrát byl odstraněn a na kolonu mikrozkušavky bylo aplikováno 750 µl promývacího pufru PE ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a opět byla provedena centrifugace při stejných parametrech. Po odstranění filtrátu byla centrifugace zopakována. Následně byla kolona přenesena do nové mikrozkušavky Eppendorf. Na kolonu bylo aplikováno 50 µl elučního pufru EB ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a bylo vyčkáno 1 minutu. Nakonec byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a 16 100 g. Kolona byla odstraněna a v získaném roztoku byla stanovena koncentrace plazmidové DNA spektrofotometricky (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, viz kapitola 0). Roztok plazmidové DNA byl poté skladován před dalším použitím při teplotě -20 °C.

4.3.4 Sekvence genu pro Bach1 vloženého ve vektoru pET-21c(+) a střední části genu pro Bach1 vloženého ve vektoru pcDNA3.1(-)

Sekvence byly provedeny externě Laboratoří sekvenace DNA PřF UK, Biocev, Průmyslová 595, Vestec, 252 50. Výsledky byly zpracovány s využitím programu Seq Scanner 2.

Pro sekvenaci genu vloženého ve vektoru pET-21c(+) bylo potřeba navrhnout pouze „primer“ pro zjištění sekvence střední části genu (viz kapitola 4.2), jejíž sekvence nemohla být z důvodu omezení metody sekvenace zjištěna s využitím komerčně dostupných „primerů“. Pro sekvenaci střední části genu vloženého ve vektoru pcDNA3.1(-) byl navržen a objednan vhodný „primer“ (viz kapitola 4.2).

Vzorky pro sekvenaci obsahovaly 300 ng plazmidové DNA v celkovém objemu 8 µl. „Primery“ byly přidány v množství 5 pmol.

4.3.5 Přenesení genu pro Bach1 z vektoru pcDNA3.1(-) do vektoru pET-21c(+)

V prvním kroku byl štěpen plazmid pET-21c(+)/*AfGcHK* pro získání linearizovaného vektoru. Tento plazmid je dlouhodobě využíván v naší laboratoři pro expresi proteinu histidinkinasy s globinovou strukturou senzorové domény (*AfGcHK*) a má ověřenou nukleotidovou sekvenci. Proto byl využit jako spolehlivý zdroj linearizovaného vektoru. Do tenkostěnné mikrozkuhavky Eppendorf bylo přeneseno 7.0 µl sterilní deionizované vody, 2.0 µl CutSmart pufru (složení chráněno obchodním tajemstvím), 0.5 µl endonukleasy *NdeI*, 0.5 µl endonukleasy *XhoI* a 10 µl vektoru pET-21c(+)/*AfGcHK*. Výsledná směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin (inkubátor IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Byly navrženy a objednané „reverse a forward primery“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí PCR a jeho následné začlenění do vektoru pET-21c(+) s využitím tzv. spojovací klonovací reakce (sekvence viz kapitola 4.2). Do tenkostěnné mikrozkuhavky Eppendorf bylo pomocí automatické pipety přeneseno 32.5 µl sterilní deionizované vody, 10 µl pufru Phusion® HF, 2.5 µl „forward primeru“, 2.5 µl „reverse primeru“, 1.0 µl směsi deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP, koncentrace každého dNTP 10 mmol.l⁻¹), 1.0 µl desetkrát zředěného roztoku vektoru pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag a 0.5 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerasy. Vzniklá reakční směs byla promíchána pomocí automatické pipety a mikrozkuhavka s touto směsí byla umístěna do termocykleru (Techne Tech Gene FTGENE2D). PCR byla provedena s parametry uvedenými v tabulce 2 (strana 40). Paralelně

byla stejným postupem provedena PCR s přidavkem 1.0 μ l dvacetkrát zředěného roztoku vektoru pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag.

Tabulka 2. Parametry použité pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.5 (vlastní zpracování).

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční denaturace	98	60
35 cyklů o třech krocích s uvedenými parametry	98	10
	58	20
	72	70
Závěrečný krok	72	480
Stabilizace	4	

Pro separaci požadovaného linearizovaného vektoru a produktu PCR byla využita agarosová elektroforéza. Bylo pro ni využito 24 μ l vzorku linearizovaného vektoru pET-21c(+) obsahujícího 6 \times koncentrovaný vzorkový pufr (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří) a 30 μ l vzorku PCR produktu (směs 25 μ l PCR produktu a 5 μ l vzorkového pufru) (viz kapitola 4.3.6). Porovnáním s markerem byly identifikovány požadované pruhy DNA odpovídající linearizovanému vektoru pET-21c(+) a genu pro Bach1. Tyto pruhy byly vyříznuty skalpelem a umístěny do předem zvážených mikrozkuvek Eppendorf. Poté byly mikrozkuvky opět zváženy pro zjištění hmotnosti agarosového pruhu.

Pro izolaci DNA z agarosových pruhů byla využita souprava Monarch® DNA Gel Extraction Kit. Do mikrozkuvky Eppendorf s agarosovým pruhem byl přidán Monarch® Gel Dissolving Buffer (400 μ l na 100 mg agarosy). Obsah mikrozkuvek byl inkubován při teplotě 50 °C (LS1, VLM Labortechnik) za občasného protřepání (ZX 3, Velp Scientifica). Po rozpuštění agarosového gelu byl vzniklý roztok přenesen na kolonu mikrozkuvek z používané soupravy a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf). Po odstranění filtrátu z mikrozkuvky bylo na kolonu přeneseno 200 μ l Monarch® DNA Wash Buffer a centrifugace byla zopakována při stejných parametrech. Celý tento proces aplikace Monarch® DNA Wash Buffer byl ještě jednou zopakován. Kolona byla vložena do čisté mikrozkuvky Eppendorf. Poté bylo na kolonu přidáno 10 μ l Monarch® DNA Elution Buffer a bylo vyčkáno 1 minutu. Následně byla

provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf) a v získaném eluátu byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, viz kapitola 4.3.11).

Dále byla provedena tzv. spojovací klonovací reakce z angl. „Fusion Cloning Reaction“ (souprava Quick-Fusion Cloning Kit). Do mikrozkušavky Eppendorf bylo aplikováno 5.0 µl získaného roztoku linearizovaného vektoru pET-21c(+), 2.75 µl získaného roztoku obsahujícího DNA kódující syntézu Bach1 („insert“), 0.2 µl Fusion Enzyme a 2.0 µl 5 × Fusion Buffer. Obsah mikrozkušavky byl inkubován po dobu 40 minut při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Následně byla provedena amplifikace takto získané plazmidové DNA. Pro transformaci buněk *E. coli* DH5α bylo použito 10 µl získané plazmidové DNA (viz kapitola 4.3.2 a 4.3.3). Po amplifikaci byla provedena sekvenace plazmidové DNA (viz kapitola 4.3.4).

4.3.6 Horizontální agarosová elektroforéza

Bylo naváženo 0.4 g agarosy (Kern 440-35N). K tomuto množství agarosy bylo přidáno 40 ml TAE pufru (0.04 mol.l⁻¹ Tris-acetát; pH 8.2; 1 mmol.l⁻¹ EDTA) a vzniklá směs byla zvážena. Pro rozpuštění agarosy byl využit ohřev v mikrovlnné troubě za pravidelného promíchání. Po rozpuštění agarosy byl roztok doplněn na původní hmotnost deionizovanou vodou. Po mírném ochlazení byly k roztoku přidány 4.0 µl barviva SYBR SAFETM DNA gel Stain. Roztok byl promíchán a přenesen do vaničky pro provádění elektroforézy a následně byl do něj umístěn plastový nástroj, tzv. „hřeben“, pro tvorbu vzorkových jamek. Směs byla ponechána stát po dobu 30 minut za účelem vytvoření gelu a ten byl poté přenesen do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec). Tato aparatura byla naplněna TAE pufrem.

Do jamek bylo pomocí automatické pipety přeneseno 24 µl vzorku linearizovaného vektoru pET-21c(+) obsahujícího 6× koncentrovaný vzorkový pufr (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří). Dále bylo do vzorkových jamek přeneseno 30 µl vzorku PCR produktu (směs 25 µl PCR produktu a 5.0 µl vzorkového pufru) a 6.0 µl 2-log Ladder standardu (1.0 µl 2-log DNA Ladder, 1.0 µl gel loading dye, 4.0 µl deionizované vody). Elektroforéza byla prováděna 30 minut při napětí 110 V. Po skončení elektroforézy byl agarosový gel přenesen na lihem očištěný povrch transiluminátoru (Dark Reader, Clare Chemical Research) pro zviditelnění separované DNA.

4.3.7 Místně cílená mutagenese

Pro provedení této metody byla využita souprava QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Nejprve byly navrženy vhodné komplementární „reverse a forward primery“ obsahující požadovanou mutaci (sekvence viz kapitola 4.2). Do tenkostěnné mikrozkušavky Eppendorf bylo přeneseno 39 µl sterilní deionizované vody, 5.0 µl 10× reaction buffer ze soupravy QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, 2.0 µl desetkrát zředěné templátové plazmidové DNA (jednalo se o gen kódující syntézu Bach1 ve vektoru pET-21c(+), získáno postupem uvedeným v kapitole 4.3.5), 1.5 µl desetkrát zředěného „forward primeru“ (viz kapitola 4.2), 1.5 µl desetkrát zředěného „reverse primeru“ (viz kapitola 4.2), 1.0 µl směsi deoxynukleotidtrifosfátů (součást soupravy QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, koncentrace jednotlivých deoxynukleotidtrifosfátů optimalizována pro tuto soupravu výrobcem). Na závěr byl ke směsi v mikrozkušavce přidán 1.0 µl PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase. Po promíchání směsi byla provedena PCR s parametry uvedenými v tabulce 3. Dále byl ke směsi přidán 1.0 µl Dpn I restriction enzym a směs byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Získanou plazmidovou DNA byly transformovány buňky *E. coli* DH5α, pro transformaci buněk *E. coli* DH5α bylo využito 5.0 µl získané plazmidové DNA (viz kapitola 4.3.2 a 4.3.3). Dále byla provedena sekvenace upraveného genu vloženého ve vektoru pET-21c(+) (viz kapitola 4.3.4).

Tabulka 3. Parametry použité pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.7 (vlastní zpracování).

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
1 cyklus	95	30
15 cyklů	95	30
	55	60
	68	450
Stabilizace	4	

4.3.8 Exprese proteinu Bach1

Nejprve bylo připraveno TB médium. V 3,6 l deionizované vody bylo rozpuštěno 48 g Bacto Tryptone a 96 g Bacto Yeast Extract. Získaný roztok byl rozdělen do 8 Erlenmayerových lahví po 450 ml. Hrdla lahví byla překryta alobalem a obsah těchto

lahví byl sterilizován (Varioklav 400E, H+P Labortechnik GmbH) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. V 300 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 9.2 g dihydrogefosforečnanu draselného a 50 g hydrogenfosforečnanu didraselného. K tomuto roztoku bylo přidáno 32 ml 50% glycerolu. Získaná směs byla doplněna deionizovanou vodou na výsledný objem 400 ml a přefiltrována přes filtrační papír. Po filtraci byl získaný roztok sterilizován (Varioklav 400E, H+P Labortechnik GmbH) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí bylo ke každým 450 ml sterilního roztoku Bacto Tryptone a Bacto Yeast Extract přidáno 50 ml sterilního roztoku fosfátů s glycerolem.

Buňky *E. coli* BL-21(DE3) byly transformovány 0.5 µl plazmidové DNA získané postupem popsáním v kapitole 4.3.7. Transformace, následná selekce transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) a příprava jednobuněčné kolonie takto transformovaných buněk byly provedeny postupem popsáním v kapitole 4.3.2.

Do každé z 8 Erlenmayerových lahví se sterilním TB médiem bylo přidáno 0.5 ml ampicilinu (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml⁻¹). Dále byla provedena inokulace pomocí 0.5 ml suspenze transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3). Obsah Erlenmayerových lahví byl ponechán inkubovat v orbitálním míchači (Infors HT Multitron Pro) při 150 RPM a teplotě 37 °C, dokud se hodnota optické denzity buněk *E. coli*, OD₆₀₀, nenacházela mezi hodnotami 0.6 až 1.2 (optická denzita měřena spektrofotometrem DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, metoda OD600). Po dosažení požadované hodnoty optické denzity byla snížena teplota inkubace na 15 °C. Následně byl odebrán vzorek pro SDS elektroforézu. Poté bylo do každé Erlenmayerovy láhve přidáno 0.1 ml IPTG (koncentrace zásobního roztoku 0.5 mol.l⁻¹) a obsah lahví byl ponechán inkubovat v orbitálním míchači (Infors HT Multitron Pro) při 120 RPM a teplotě 15 °C po dobu 17 hodin. Po uplynutí uvedené doby byl odebrán vzorek pro SDS elektroforézu. Expres proteinu Bach1 byla ukončena centrifugací buněk při teplotě 4 °C a 3 000 RPM po dobu 45 minut (Janetzki K 70 D, MLW). Byla zjištěna hmotnost získaných buněk (HM-200, A&D Instruments LTD) a tyto byly uchovány při teplotě -80 °C pro pozdější využití.

4.3.9 Izolace proteinu Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Zmražené buňky získané postupem popsáním v kapitole 0 byly rozmrazeny na ledu a následně resuspendovány v resuspendačním pufru (50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol.l⁻¹ NaCl; 1 mmol.l⁻¹ EDTA; 1mmol.l⁻¹ PMSF; 0.2 mg/ml lysosym; na 5 g buněk použito asi 32 ml resuspendačního pufru). Následně byla za stálého míchání a chlazení na ledu provedena celkem šestkrát ultrazvuková sonikace buněk po dobu 1 minuty při amplitudě 50 % (Sonopuls

HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Mezi jednotlivými kroky sonikace byly ponechány jednominutové pauzy.

Vzniklá směs byla rozdělena na dvě stejné části o objemu asi 70 ml. Jedna část byla ponechána inkubovat za stálého míchání (Mini Rocker MR-1, BioSan) inkubována se 4.2 ml roztoku heminu (zásobní roztok 5 mmol.l⁻¹ heminu v dimethylsulfoxidu) po dobu 20 minut při teplotě 4 °C, druhá část byla ponechána inkubovat za stejných podmínek bez přídavku heminu. Následné kroky byly prováděny paralelně s lyzáty buněk bez přídavku heminu i s jeho přídavkem. Lyzované buňky byly dále podrobeny ultracentrifugací po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C a 55 000 RPM (Beckman Optima™ LE-80K). Ze získaných supernatantů byly odebrány vzorky pro SDS elektroforézu.

Pro izolaci proteinu Bach1 z cytosolární frakce buněk byla využita afinitní chromatografie ve vsádkovém provedení. Afinitní nosič o objemu 2 ml (TALON® Metal Affinity Resin) byl ekvilibrován ekvilibračním pufrům (50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol.l⁻¹ NaCl) pomocí centrifugace (Allegro X-22R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C a 750 RPM po dobu 2 minut, (použito třikrát 5 ml daného pufru). Takto ekvilibrovaný nosič byl inkubován za stálého míchání po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C se supernatanty získanými předchozí ultracentrifugací (Mini Rocker MR-1, BioSan). Následně byly směsi převedeny na chromatografické kolony s fritou. Zde byly směsi promyty třikrát 15 ml ekvilibračního pufru. Ze získaného eluátu byl odebrán vzorek pro SDS elektroforézu. Poté byla provedena eluce 10 ml elučního pufru. Eluáty byly zachyceny do zkumavek a byl z nich odebrán vzorek pro SDS elektroforézu. Následně byly získané eluáty inkubovány s 0.5 ml 2-merkptoethanolu (zásobní roztok 100 mmol.l⁻¹) po dobu 1 hodiny. Poté byly eluáty přeneseny do speciálních kyvet Amicon určených k zakoncentrování vzorků proteinů a byla provedena centrifugace při teplotě 4 °C a 4 000 RPM po dobu 2 minut (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Centrifugace byla při stejných parametrech opakována, dokud nebyl získán asi 1 ml vzorku proteinu.

Získaný protein byl dále purifikován pomocí gelové chromatografie (přístroj Amersham Biosciences UPC-900, kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL - pro kalibraci kolony byly využity proteiny thyroglobulin (669 kDa, eluční objem 8.6 ml), apoferritin (481 kDa, eluční objem 9.5 ml), aldolasa (158 kDa, eluční objem 12.1 ml), BSA (66 kDa, eluční objem 13.2 ml) a ovalbumin (43 kDa, eluční objem 14.4 ml)). Jako mobilní fáze byl použit roztok 20 mmol.l⁻¹ Tris obsahující 150 mmol.l⁻¹ NaCl. U všech frakcí byla sledována absorbance při 280 nm. Byly odebrány frakce obsahující izolovaný protein Bach1. Získané frakce byly spojeny a zakoncentrovány centrifugací při teplotě 4 °C a 4 000 RPM pomocí

speciálních kyvet Amicon na objem asi 400 μl (Allegro X-22R, Beckman Coulter). V získaných supernatantech (finální preparáty proteinu Bach1) byla stanovena koncentrace izolovaného proteinu Bach1 (viz kapitola 0) a byly z nich odebrány vzorky pro SDS elektroforézu. Finální preparát proteinu Bach1 byl rozdělen do alikvotů o objemu 150 μl . Tyto alikvoty byly zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.10 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Nejprve byla sestavena aparatura pro SDS elektroforézu se dvěma skly (Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio Rad). Byl připraven roztok pro vznik separačního gelu (10% w/v) smícháním 6.7 ml pufru A (0.375 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0.1% SDS (w/v), pH 8.8), 3.3 ml polymeračního roztoku A (30% w/v akrylamid; 0.8% w/v BIS v pufru A), 10 μl TEMED a 100 μl peroxodisíranu amonného (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml^{-1}). Po promíchání byl připravený roztok pro vznik separačního gelu přenesen mezi dvě skla umístěná vertikálně v aparatuře pro elektroforézu. Nanesený roztok pro vznik separačního gelu byl převrstven deionizovanou vodou. Po uplynutí 30 minut byla nanesená voda odstraněna. Byl připraven roztok pro vznik zaostřovacího gelu (4% w/v) smícháním 2.6 ml pufru B (0.125 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0.1% w/v SDS, pH 6.8; 0.0006% bromfenolová modř), 400 μl polymeračního roztoku B (30% w/v akrylamid; 0.8% w/v BIS v pufru B), 3.0 μl TEMED a 60 μl peroxodisíranu amonného (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml^{-1}). Vzniklá směs byla po promíchání nanesena na vrstvu separačního gelu. Do roztoku pro vznik zaostřovacího gelu byl vložen speciální plastový díl elektroforetické sady, který zajistí vznik jamek v zaostřovacím gelu (tzv. „deseti-jamkový hřeben“). Poté byla aparatura přenesena do elektroforetické vany. Vzniklý prostor mezi dvojicemi skel i elektroforetická vana byly naplněny elektrodoým pufrem (0.025 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0.192 mol.l^{-1} glycin; 0.1% w/v SDS, pH 8.3). Vzorky odebrané během předchozích experimentů byly smíchány s vzorkovým redukcujícím pufrem (čtyřikrát koncentrovaným obsahujícím 0.25 mol.l^{-1} Tris-HCl; 8% w/v SDS; 40% v/v glycerol; 20% v/v 2-merkptoethanol; 0.012% w/v bromfenolovou modř, pH 6.8) a deionizovanou vodou (viz tabulka 4, strana 46). Takto upravené vzorky byly inkubovány při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut v inkubátoru (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) a poté krátce odstředěny pomocí stolní minicentrifugy (Gilson, GmC Lab). Po vyjmutí „hřebenu“ a po převrstvení jamek elektrodoým pufrem byly do jamek zaostřovacího gelu aplikovány vzorky a standard (Precision Plus Protein™ Standards). Elektroforéza probíhala po dobu 1 hodiny při napětí 200 V (EPS 301, Electrophoresis Power

Supply, Amersham Pharmacia Biotech). Po skončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel. Separační gel byl přenesen do Petriho misky obsahující barvicí lázeň (0.25% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% v/v ethanol; 9.2% v/v octová kyselina). Barvení separačního gelu probíhalo za stálého třepání po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl obarvený separační gel umístěn do Petriho misky s odbarvovací lázní (25% v/v ethanol; 10% v/v octová kyselina), kde byl ponechán odbarvovat za stálého třepání po dobu 40 minut. Poté byla odbarvovací lázeň vyměněna a odbarvování bylo prováděno dalších 17 hodin.

Tabulka 4. Příprava vzorků pro SDS elektroforézu (vlastní zpracování).

Typ vzorku	Objem odebraného vzorku (μl)	Objem deionizované vody (μl)	Objem vzorkového pufru (μl)
Buňky před indukcí IPTG	11.25	0	3.75
Buňky po indukcí IPTG	11.25	0	3.75
Supernatant po ultracentrifugaci	5.00	2.50	2.50
Eluát v ekvilibračním pufru po afinitní chromatografii	7.5	3.75	3.75
Eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii	11.25	0	3.75
Frakce získané pomocí gelové chromatografie	11.25	0	3.75
Finální preparát proteinu Bach1 (po zakoncentrování)	1.75	3.5	1.75
	3.75	7.5	3.75

4.3.11 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA a proteinu v roztoku

Pro stanovení koncentrace plazmidové DNA v roztoku byla využita metoda „dsDNA“ v mikroobjemu (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix). Jako „blank“ byla použita

deionizovaná voda. Na detekční plochu spektrofotometru byly aplikovány 2.0 µl „blanku“ (tj. deionizované vody) a poté stejný objem roztoku plazmidové DNA. Koncentraci plazmidové DNA v roztoku určuje přístroj na základě měření absorbance při 260 nm dle vztahu:

$$c = \frac{A \cdot CF}{l},$$

v němž c je koncentrace plazmidové DNA v roztoku v jednotkách $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, A je absorbance při 260 nm, CF je přepočítávací faktor v jednotkách $\text{ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (pro dvouřetězcovou DNA byla výrobcem stanovena hodnota tohoto faktoru $CF = 50 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a l je šířka absorpčního prostředí v jednotkách cm. S využitím stejné metody přístroje bylo možno zjistit i poměr absorbance roztoku obsahujícího DNA při 260 nm ku absorbanci při 280 nm.

Pro stanovení koncentrace proteinu v roztoku byla použita souprava Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit. Jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardem byl hovězí sérový albumin (BSA) o různých koncentracích. Stanovení bylo prováděno s využitím mikrotitračních 96-jamkových destiček. Pracovní reagent byl připraven smícháním reagentu A (hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný, bicinchoninová kyselina (BCA), vinan sodný v $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydroxidu sodném, koncentrace složek chráněna obchodním tajemstvím) a reagentu B (4% síran měďnatý) v poměru 50:1 (v uvedeném pořadí). Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno po 9.0 µl blanku (deionizovaná voda), standardů (BSA o koncentracích $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $24 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $32 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $48 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $64 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ postupně do jednotlivých jamek) a vzorku finálního preparátu proteinu Bach1 a 260 µl pracovního reagentu. Následovala inkubace při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Pomocí čtečky destiček (Infinite M200 PRO, Tecan) byly změřeny absorbance roztoků v jednotlivých jamkách při 562 nm. Na základě hodnot absorbancí standardů o známé koncentraci BSA byla sestavena kalibrační přímka. S využitím této kalibrační přímky byla následně odečtena koncentrace finálního preparátu proteinu Bach1.

4.3.12 Spektrofotometrická charakterizace proteinu Bach1

Získané preparáty proteinu Bach1 bez inkubace s heminem během izolace (tzv. „apoforma“) a inkubované s heminem (tzv. „holoforma“) byly charakterizovány spektrofotometricky. Finální preparát proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ nebyl před spektrofotometrickou charakterizací ředěn, finální preparát proteinu Bach1 v jeho „apoformě“ byl před spektrofotometrickou charakterizací dvakrát ředěn s využitím roztoku

20 mmol.l⁻¹ Tris, pH 8.0 obsahujícího 150 mmol.l⁻¹ NaCl. Poté bylo změřeno absorpční spektrum v intervalu vlnových délek 200-700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies).

5 Výsledky

5.1 Plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag poskytnutý spolupracujícím pracovištěm

Spolupracující laboratoří prof. Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan byl poskytnut vektor pET-21c(+)/Bach1-Histag, který obsahoval gen pro myši Bach1 s histidinovou kotvou na C-konci. Plazmid byl nanesen sterilně na filtrační papír a po evaporaci většiny rozpouštědla byl tento vpraven do sterilního polyethylenového obalu. Tento plazmid byl úspěšně izolován z filtračního papíru postupem popsáním v kapitole 4.3.1. Koncentrace pET-21c(+)/Bach1-Histag v získaném roztoku byla $27.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.79. Pro další práci se získanou plazmidovou DNA (pET-21c(+)/Bach1-Histag) ji bylo potřeba namnožit a následně izolovat. Vektorem pET-21c(+)/Bach1-Histag poskytujícím rezistenci vůči ampicilinu byly úspěšně transformovány buňky *E. coli* DH5 α (viz kapitola 4.3.2). Na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách vyrostlo velké množství kolonií buněk *E. coli* DH5 α transformovaných vektorem pET-21c(+)/Bach1-Histag (data nejsou ukázána). Několik těchto kolonií bylo vybráno, byly připraveny a namnoženy jednobuněčné klony (viz kapitola 4.3.2.). Velmi důležitým zjištěním v tomto kroku práce byla absence kolonií buněk *E. coli* DH5 α , které nebyly plazmidem transformovány, a tedy nenesly rezistenci na antibiotikum ampicilin (data nejsou ukázána). Z tohoto pozorování lze vyvodit, že práce byla aseptická a nedošlo ke znehodnocení kompetentních buněk. Amplifikovaná plazmidová DNA byla z namnožených buněk izolována postupem popsáním v kapitole 4.3.3. Koncentrace pET-21c(+)/Bach1-Histag v získaném roztoku byla $179 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.72.

Pro ověření, zda izolovaná a následně amplifikovaná plazmidová DNA obsahovala nepoškozený gen pro protein Bach1, byla provedena sekvenace genu vloženého do vektoru pET-21c(+) (viz kapitola 4.3.4). S využitím komerčně dostupných „primerů“ nebyla v důsledku omezení používané metody zjištěna sekvence celého genu vloženého do vektoru pET-21c(+), ale jen část kódující aminokyseliny na pozicích 1-292 a 452-739. Nicméně porovnáním aminokyselinové sekvence, již kódoval gen vložený do vektoru pET-21c(+), s aminokyselinovou sekvencí myšního proteinu Bach1, uvedenou v databázi UniProt [48], byly

v části genu Bach1 nalezeny dvě mutace (viz obrázek 11). Tyto mutace se nacházely na pozicích 2 (záměna aminokyseliny serinu za threonin, respektive prvního nukleotidu kodonu, thyminu za adenin) a 592 (záměna aminokyseliny izoleucinu za threonin, respektive druhého nukleotidu kodonu, thyminu za cytosin). Vzhledem k možné existenci dalších mutací v části genu, jejíž sekvence nebyla zjištěna, bylo rozhodnuto dále s tímto vektorem nepracovat.

Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	MSVSES AVFAYESSVHSTNVLLSLNDQRKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH MTVSES AVFAYESSVHSTNVLLSLNDQRKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	SRIVGQTDAELTVTLPEEVTVKGFELIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE SRIVGQTDAELTVTLPEEVTVKGFELIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHCKADFKFSFSEQKDLEIDEAEFLEKKRVQ SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHCKADFKFSFSEQKDLEIDEAEFLEKKRVQ *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	TPQCDSRRQCQSVKASPPLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFQKAFGTDKIR TPQCDSRRQCQSVKASPPLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFQKAFGTDKIR *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAQGCADLHVILKCEGMKAAMESEDTEGQDPSPQ TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAQGCADLHVILKCEGMKAAMESEDT----- *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	CPAEQPGGTPLPQDSAGPHGLYLSALHTYEQSGDVAFAVGVSQKTVKTEKPLSRPDAQDE -----
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	KPSENQDLYLKSSMGPKEDSSSLASEDRSSVEREVAEHLAKGFWSDICSTDSPCQMQLSP -----
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	TVAKDGPEQGYQRRSECPWLGRISESPEPGQRTFTTLSSVNCPISTLSSEGCSNLE -----GQRTFTTLSSVNCPISTLSSEGCSNLE *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	IGNYDYVSEPPQEPQPYACVISLGDDSETDTEGDSSECSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS IGNYDYVSEPPQEPQPYACVISLGDDSETDTEGDSSECSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	RNDFQSLKMKHLTPEQLDCIHDIRRRSKNRIAAQRCRKRKLDCIQNLESETEKLQSEKE RNDFQSLKMKHLTPEQLDCIHDIRRRSKNRIAAQRCRKRKLDCIQNLESETEKLQSEKE *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	SLLKERDHLSTLGETKQNL TGLCQQVCKEAAAL SPEQIQILAKYSASDCPLSFLISEKGK SLLKERDHLSTLGETKQNL TGLCQQVCKEAAAL SPEQIQILAKYSASDCPLSFLISEKGK *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	STPDGELAFTSVFVSVDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPPTTAAAPEQATLLEPCRQ STPDGELAFTSVFVSVDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPPTTAAAPEQATLLEPCRQ *****
Bach1MouseUniprotP97302 Bach1Sequenced	SAGISDFCQQMSDKCTTDE SAGISDFCQQMSDKCTTDE *****

Obrázek 11. Porovnání aminokyselinové sekvence, již kódoval gen vložený ve vektoru pET-21c(+) izolovaný z filtračního papíru (dolní řádek), s aminokyselinovou sekvencí myšního proteinu Bach1 dle databáze UniProt [48] (horní řádek). Vlivem omezení metody sekvenace nebyla zjištěna sekvence celého genu vloženého ve vektoru pET-21c(+). Červeně jsou vyznačeny mutované aminokyseliny (vlastní zpracování).

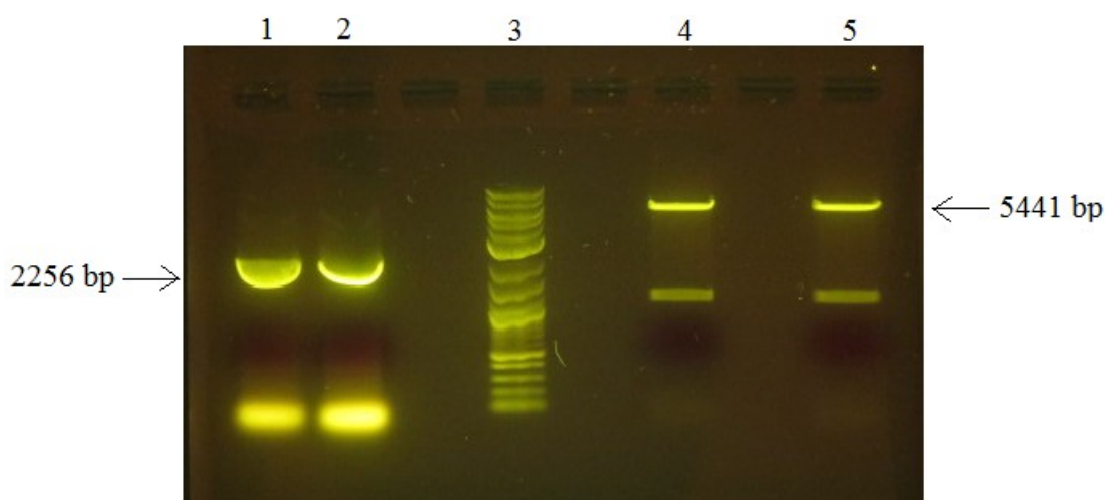
5.2 Příprava vlastního plazmidu pET-21c(+)/Bach1-Histag

Pro další práci byl využit jiný plazmid, dodatečně zasláný laboratoří profesora Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan. Konkrétně se jednalo o plazmid pro eukaryotní expresi, který obsahuje gen pro myši Bach1 s histidinovou kotvou na C-konci, tj. pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag. Správná sekvence nukleotidů genu pro Bach1 vloženého v tomto vektoru byla potvrzena japonskou laboratoří v době před zasláním toho plazmidu poštou do naší laboratoře v České republice. Byl zvolen stejný způsob zaslání jako v případě prvního plazmidu (viz kapitola 5.1), tj. plazmid byl nanesen sterilně na filtrační papír a po evaporaci většiny rozpouštědla byl tento vpraven do sterilního polyethylenového obalu. Plazmid pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag byl úspěšně izolován z filtračního papíru postupem popsáním v kapitole 4.3.1. Koncentrace pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag v získaném roztoku byla $7.35 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.72.

Pro další práci se získanou plazmidovou DNA (pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag) ji bylo potřeba namnožit a následně izolovat. Vektorem pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag poskytujícím rezistenci vůči ampicilinu byly úspěšně transformovány buňky *E. coli* DH5 α (viz kapitola 4.3.2). Na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách vyrostlo velké množství kolonií buněk *E. coli* DH5 α transformovaných vektorem pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag (data nejsou ukázána). Několik těchto kolonií bylo vybráno, byly připraveny a namnoženy jednobuněčné klony (viz kapitola 4.3.2.). Velmi důležitým zjištěním v tomto kroku práce byla absence kolonií netransformovaných buněk *E. coli* DH5 α na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách (data nejsou ukázána). Práce s kompetentními buňkami tedy byla provedena asepticky a nedošlo k jejich znehodnocení. Amplifikovaná plazmidová DNA byla z namnožených buněk izolována postupem popsáním v kapitole 4.3.3. Koncentrace pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag v získaném roztoku byla $533 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.96.

Amplifikovaný vektor pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag byl použit jako zdroj genu pro Bach1. Zdrojem vektoru pro prokaryotní expresi byl plazmid pET-21c(+)/*AfGcHK*. V této části řešení bakalářské práce bylo třeba zavést gen kódující protein Bach1 do vektoru pET-21c(+) a nahradit gen pro jiný senzorový protein, *AfGcHK*. Linearizovaný vektor pET-21c(+) byl získán postupem popsáním v kapitole 4.3.5. Amplifikace genu pro Bach1

obsaženém ve vektoru pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag byla úspěšně provedena s využitím PCR (viz kapitola 4.3.5). Separace linearizovaného vektoru pET-21c(+) a amplifikovaného genu pro Bach1 byla úspěšně provedena s využitím horizontální agarosové elektroforézy (viz kapitola 4.3.6). Snímek agarosového gelu s vyznačením oblastí, kde se nacházejí odpovídající linearizovaný vektor pET-21c(+) (5 441 bp) a amplifikovaný gen pro Bach1-Histag (2 256 bp) po provedení elektroforézy je na obrázku 12. Pro další práci byly pomocí skalpelu vyříznuty horní pruhy z drah číslo 2 (2 256 bp) a 5 (5 441 bp). Hmotnost agarosového pruhu obsahujícího linearizovaný vektor pET-21c(+) byla 95.3 mg. Hmotnost agarosového pruhu obsahujícího amplifikovaný gen pro Bach1 byla 107.9 mg.

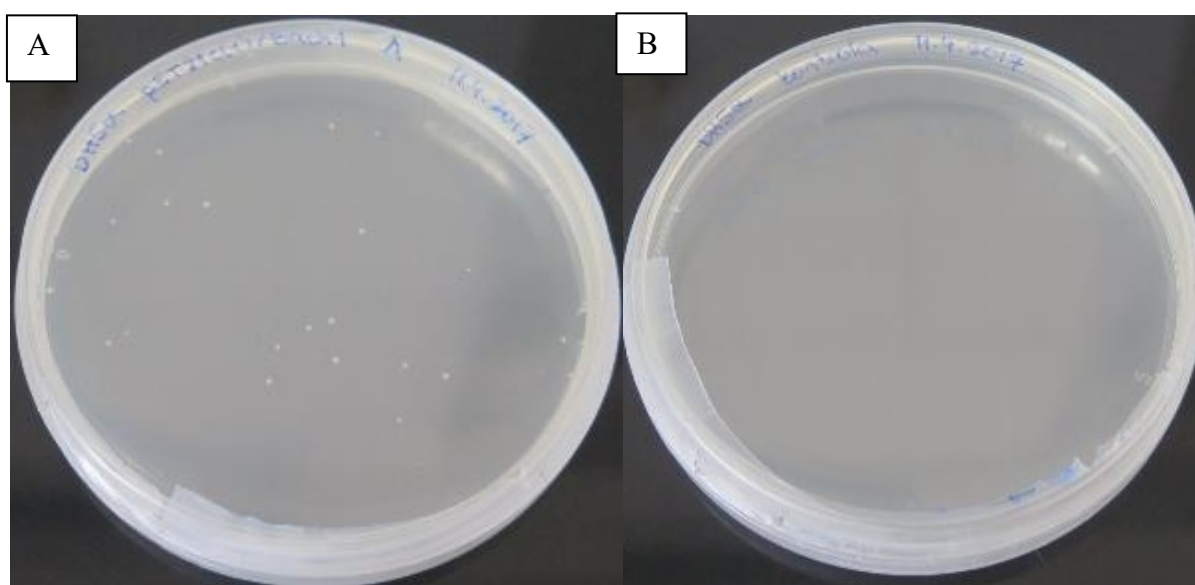


Obrázek 12. Separace linearizovaného vektoru pET-21c(+) a amplifikovaného genu pro Bach1 pomocí agarosové elektroforézy (vlastní zpracování).

Dráha 1: vzorek PCR produktu po amplifikaci genu pro Bach1, pro PCR použit desetkrát zředěný roztok vektoru pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag; Dráha 2: vzorek PCR produktu po amplifikaci genu pro Bach1, pro PCR použit dvacetkrát zředěný roztok vektoru pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag; Dráha 3: marker 2-log Ladder; Dráha 4 a 5: vzorek linearizovaného vektoru pET-21c(+).

Po separaci pomocí agarosové elektroforézy byly linearizovaný vektor pET-21c(+) a amplifikovaný gen pro Bach1 izolovány z agarosových pruhů (viz kapitola 4.3.5). Byl získán roztok obsahující linearizovaný vektor pET-21c(+) o koncentraci $21.2 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$ (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.85) a roztok obsahující amplifikovaný gen pro Bach1 o koncentraci $112.5 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$ (poměr absorbance roztoku obsahujícího tento gen při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.83). Poté byla provedena tzv. spojovací klonovací reakce (viz kapitola 4.3.5) a získaným vektorem byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α pro jeho amplifikaci (viz kapitola 4.3.2). Transformace proběhla úspěšně, na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách vzniklo

několik kolonií (viz obrázek 13A). Bylo vybráno několik vzniklých kolonií, následně byly připraveny a namnoženy jednobuněčné klony (viz kapitola 4.3.2). Velmi důležitým zjištěním v tomto kroku práce byla absence kolonií buněk *E. coli* DH5 α , které nebyly plazmidem transformovány, a tedy nenesly rezistenci na antibiotikum ampicilin (viz obrázek 13B). Z tohoto pozorování můžeme vyvodit, že práce byla aseptická a nedošlo ke znehodnocení kompetentních buněk. Amplifikovaná plazmidová DNA byla z namnožených buněk izolována postupem popsáním v kapitole 4.3.3. Koncentrace plazmidové DNA (pET-21c(+)/Bach1-Histag) v získaném roztoku byla 103.8 ng. μ l⁻¹. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.92.



Obrázek 13. A - Agarové médium obsahující ampicilin s koloniemi buněk *E. coli* DH5 α transformovanými plazmidem pET-21c(+)/Bach1-Histag; B - Kontrolní agarové médium (vlastní zpracování).

Pro potvrzení, že během manipulace s genem pro Bach1 nedošlo k žádné mutaci, byla provedena sekvenace tohoto genu v získaném vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag (viz kapitola 4.3.4). Protože z předchozího provedení sekvenace bylo známo, že komerčně dostupné „primery“ neumožní sekvenaci genu pro Bach1 v celé jeho délce, byl navrhnut další „primer“ (sekvence viz kapitola 4.2). To umožnilo zjistit celou aminokyselinovou sekvenci (viz obrázek 14, strana 54), již kódoval gen vložený ve vektoru pET-21c(+) metodou spojovací klonovací reakce.

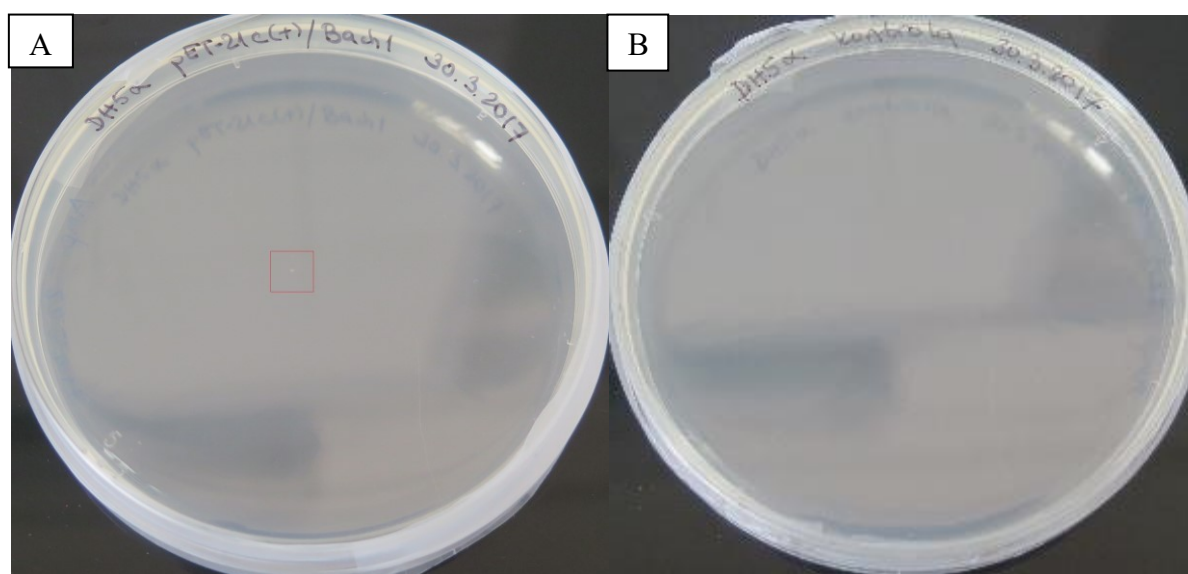
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	MSVSES AVFAYESSVHSTNVL LSLNDQ RKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH MSVSES AVFAYESSVHSTNVL LSLNDQ RKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SRIVGQ TDAELTVTLPEEVTVKGF EPLIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE SRIVGQ TDAELTVTLPEEVTVKGF EPLIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHQKADFKFSFSEQKDLEIDEADEFLEKKRVQ SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHQKADFKFSFSEQKDLEIDEADEFLEKKRVQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TPQCDSRR CQGSVKAS PPLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFKQAFGTDKIR TPQCDSRR CQGSVKAS PPLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFKQAFGTDKIR *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAQGCADLHVILKCEGMKAAMESEDTEGQDPSPQ TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAQGCADLHVILKCEGMKAAMESEDTEGQDPSPQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	CPAEQPQG TPLPQDSAGPHGLYSLALHTYEQSGDVAFAGVQSKTVKTEKPLSRPDAQDE CPAEQPQG TPLPQDSAGPHGLYSLALHTYEQSGDVAFAGVQSKTVKTEKPLSRPDAQDE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	KPSENQDLYLKSSMGPKEDSSSLASEDRSSVEREVAEHLAKGFWSDICSTDSPCQMQLSP KPSENQDLYLKSSMGPKEDSSSLASEDRSSVEREVAEHLAKGFWSDICSTDSPCQMQLSP *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TVAKDGPEQGY SQRRECPWL GRISESPEPGQRTFTLSSVNCPISTLSSEGCSNLE TVAKDGPEQGY SQRRECPWL GRISESPEPGQRTFTLSSVNCPISTLSSEGCSNLE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	IGNYDYVSE PQQEP CPYACVISLGDDSETDTEGDSESCSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS IGNYDYVSE PQQEP CPYACVISLGDDSETDTEGDSESCSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	RNDFQSL LKMHKL TPEQLDCI HDIRRRSKNR IAAQRCRKRLDCIQNLESEIEKLQSEKE RNDFQSL LKMHKL TPEQLDCI HDIRRRSKNR IAAQRCRKRLDCIQNLESEIEKLQSEKE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SLLKERDHI LSTLGETKQNL TGLCQVCKEAA LSPEQIQILAKYASDCPLSFLISEKGK SLLKERDHI LSTLGETKQNL TGLCQVCKEAA LSPEQIQILAKYASDCPLSFLISEKGK *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	STPDGELAFTSVF SVSDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPTTAAPEQATLLEPCRQ STPDGELAFTSVF SVSDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPTTAAPEQATLLEPCRQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SAGISDFCQ QMSDKCTTDE SAGISDFCQ QMSDKCTTDE *****

Obrázek 14. Porovnání aminokyselinové sekvence, již kódoval gen vložený ve vektoru pET-21c(+) připraveném metodou spojovací klonovací reakce (dolní řádek), s aminokyselinovou sekvencí myšního proteinu Bach1 dle databáze UniProt [48] (horní řádek). Díky navrženému „primeru“ byla zjištěna sekvence celého genu vloženého ve vektoru pET-21c(+). Červeně je vyznačena mutovaná aminokyselina (vlastní zpracování).

Porovnáním aminokyselinové sekvence, již kódoval gen vložený ve vektoru pET-21c(+) metodou spojovací klonovací reakce, s aminokyselinovou sekvencí myšního proteinu Bach1, uvedenou v databázi UniProt [48], byla v genu nalezena jedna mutace. Tato

mutace se nacházela na pozici 196 (záměna aminokyseliny serinu za prolin, respektive prvního nukleotidu kodonu, thyminu za cytosin). Pro ověření, že k této mutaci došlo během manipulace s genem, byla provedena sekvenace potřebné části genu vloženého ve vektoru pcDNA3.1(-) získaném izolací z filtračního papíru (viz kapitola 4.3.1). Pro tuto sekvenaci bylo potřeba navrhnout „primer“ (viz kapitola 4.2). Sekvenací bylo zjištěno, že nalezená mutace se nacházela již v plazmidu pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag, který byl zaslán spolupracující japonskou laboratoří prof. Kazukiho Igarashiho.

Vzhledem k tomu, že gen vložený ve vektoru pET-21c(+) metodou spojovací klonovací reakce obsahoval pouze jednu mutaci, bylo rozhodnuto ji opravit metodou místně cílené mutagenese (viz kapitola 4.3.7). Vektorem pET-21c(+) s opravenou sekvencí genu pro Bach1 byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α pro jeho amplifikaci (viz kapitola 4.3.2). Transformace proběhla úspěšně, na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách vznikla jedna kolonie (viz červený čtverec na obrázku 15A). Byly připraveny a namnoženy jednobuněčné klony (viz kapitola 4.3.2). Pro tento krok práce byla důležitá absence kolonií netransformovaných buněk *E. coli* DH5 α na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách (viz obrázek 15B). Z této absence lze vyvodit, že práce byla aseptická a nedošlo ke znehodnocení kompetentních buněk. Amplifikovaná plazmidová DNA byla z namnožených buněk izolována postupem popsáním v kapitole 4.3.3. Koncentrace plazmidové DNA (pET-21c(+)/Bach1-Histag s opravenou sekvencí genu pro Bach1) v získaném roztoku byla 116.0 ng. μ l⁻¹. Poměr absorbance roztoku obsahujícího tento plazmid při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.53.



Obrázek 15. A - Agarové médium s vyznačenou kolonií buněk *E. coli* DH5 α transformovaných plazmidem pET-21c(+)/Bach1-Histag s opravenou sekvencí genu pro Bach1.; B - Kontrolní agarové médium (vlastní zpracování).

Pro potvrzení, že během provádění metody místně cílené mutagenese došlo k požadované mutaci, byla provedena sekvenace genu vloženého v získaném vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag (viz kapitola 4.3.4). Z obrázku 16 je patrné, že mutace v genu pro Bach1 byla úspěšně opravena.

sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	MSVSESAVFAYESSVHSTNVLLSLNDQRKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH MSVSESAVFAYESSVHSTNVLLSLNDQRKKDVLCDVTVLVEGQRFRAHRSVLAACSSYFH *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SRIVGQTDALVTLPPEEVTVKGFELIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE SRIVGQTDALVTLPPEEVTVKGFELIQFAYTAKLILSKDNVDEVCRCEFLSVHNIEE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHQKADFKFSFSEQKLEIDEADEFLEKKRVQ SCFQFLKFKFLDSTSEQQECARKKCFSSHQKADFKFSFSEQKLEIDEADEFLEKKRVQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TPQCDSRRCCGGSVKA[SP]PLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFKAFGTDKIR TPQCDSRRCCGGSVKA[SP]PLQDSVSQACQSLCTDKDGALALPSLCPKYRKFKAFGTDKIR *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAGCADLHVILKCEGMKAAMESEDTEGGQDPSQ TLESGVRDVHTASVQPNETSELECFGGAGCADLHVILKCEGMKAAMESEDTEGGQDPSQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	CPAEQPGGTPLQDSAGPHGLYLSALHTYEQSGDVAFAGVQSKTVKTEKPLSRPDAQDE CPAEQPGGTPLQDSAGPHGLYLSALHTYEQSGDVAFAGVQSKTVKTEKPLSRPDAQDE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	KPSENQDLYLKSSMGPKEDSSSLASEDRSSVEREVAEHLAKGFWSIDICSTDSPCQMQLSP KPSENQDLYLKSSMGPKEDSSSLASEDRSSVEREVAEHLAKGFWSIDICSTDSPCQMQLSP *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	TVAKDGPEQGYSQRRSECPWLGIIRISESPEPGQRTFTTLSSVNCPFISTLSSEGCSNLE TVAKDGPEQGYSQRRSECPWLGIIRISESPEPGQRTFTTLSSVNCPFISTLSSEGCSNLE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	IGNYDYVSEPQQEPCPYACVISLGDDSETDTGDSSESCSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS IGNYDYVSEPQQEPCPYACVISLGDDSETDTGDSSESCSAREQDCEVKLPFNAQRIISLS *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	RNDFQSLLKMHKLTPEQLDCIHDIRRSKNRIAAQRCRKRKLDICIQNLESEIEKLQSEKE RNDFQSLLKMHKLTPEQLDCIHDIRRSKNRIAAQRCRKRKLDICIQNLESEIEKLQSEKE *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SLLKERDHILSTLGETKQNLTLGLCQQVCKEAALSPEIQIILAKYASDCPLSFLISEKGK SLLKERDHILSTLGETKQNLTLGLCQQVCKEAALSPEIQIILAKYASDCPLSFLISEKGK *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	STPDGELAFTSVFVSVDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPTTAAAEQATLLEPCRQ STPDGELAFTSVFVSVDVPPTAPPPCGRGSSAASQELVQESPTTAAAEQATLLEPCRQ *****
sp P97302 BACH1_MOUSE Bach1	SAGISDFCQQMSDKCTTDE SAGISDFCQQMSDKCTTDE *****

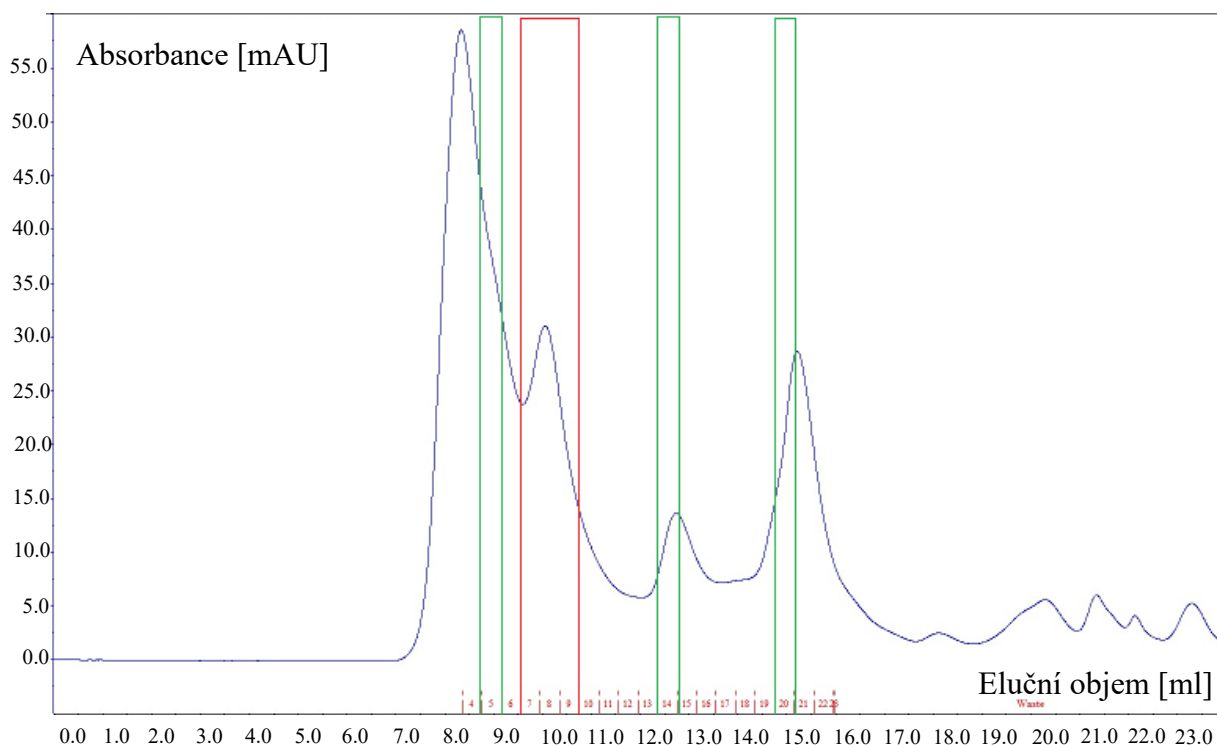
Obrázek 16. Porovnání aminokyselinové sekvence, již kódoval gen vložený ve vektoru pET-21c(+)
a upravený metodou místně cílené mutagenese (dolní řádek), s aminokyselinovou sekvencí myšního
proteinu Bach1 dle databáze UniProt [48] (horní řádek). Červeně je vyznačena původně mutovaná
aminokyselina (vlastní zpracování).

5.3 Exprese proteinu Bach1

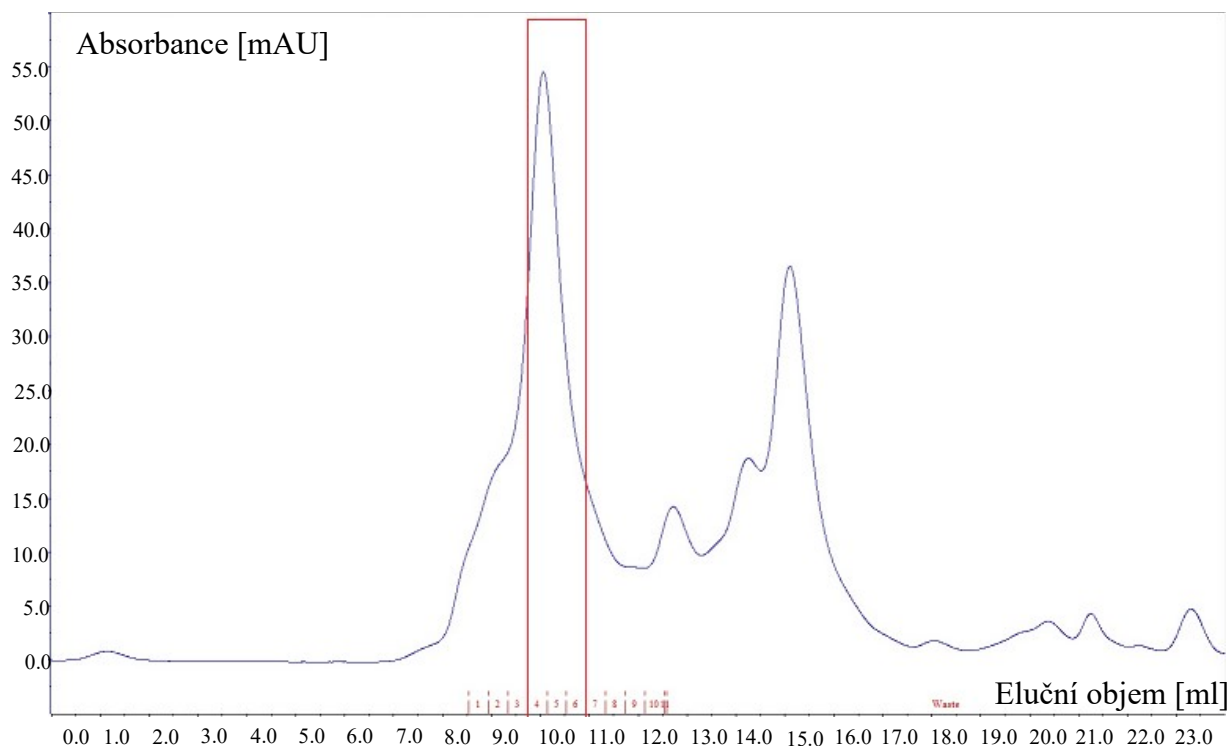
Získaná plazmidová DNA pET-21c(+)/Bach1-Histag se správnou sekvencí vloženého genu pro Bach1 byla využita pro expresi proteinu Bach1 v prokaryotním expresním systému *E. coli* buněk. Nejprve byly touto plazmidovou DNA transformovány buňky *E. coli* BL-21(DE3) (viz kapitola 4.3.2). Transformace byla úspěšně provedena, na agarovém médiu obsahujícím ampicilin v Petriho miskách vzniklo několik kolonií (data nejsou ukázána). Z vybraných kolonií byly připraveny a namnoženy jednobuněčné klony (viz kapitola 4.3.2). Velmi důležitým zjištěním v tomto kroku práce byla absence kolonií buněk *E. coli* BL-21(DE3), které nebyly plazmidem pET-21c(+)/Bach1-Histag transformovány (data nejsou ukázána). Z tohoto pozorování můžeme vyvodit, že práce byla aseptická a nedošlo ke znehodnocení kompetentních buněk. Exprese proteinu Bach1 byla provedena postupem popsáným v kapitole 0. Optická denzita OD₆₀₀ dosáhla hodnoty 0.6 za dobu 4 hodin. Hmotnost získaných buněk ze 4l TB média činila 21.6 g, tj. 5.4 g/l média. Během exprese proteinu Bach1 byly pro SDS elektroforézu odebrány vzorky buněk *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG a po indukci IPTG (viz obrázek 20, strana 61, dráhy 2 a 3 v uvedeném pořadí a obrázek 21, strana 61, dráhy 2 a 3 v uvedeném pořadí).

5.4 Izolace proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ a „apoformě“

Exprimovaný protein Bach1 byl z buněk *E. coli* BL-21(DE3) izolován postupem popsáným v kapitole 4.3.9. Pomocí afinitní a gelové chromatografie byly získány preparáty proteinu Bach1 inkubované během izolace s heminem (tzv. „holoforma“) (viz obrázek 17, strana 58) a bez inkubace s heminem během izolace (tzv. „apoforma“) (viz obrázek 18, strana 58).



Obrázek 17. Záznam z gelové chromatografie prováděné při izolaci proteinu Bach1 v jeho „holoformě“. Zeleně jsou vyznačeny frakce číslo 5 (eluční objem 9.0 ml), 14 (eluční objem 12.5 ml) a 20 (eluční objem 15.0 ml), z nichž byl odebrán vzorek pro SDS elektroforézu. Červeně jsou vyznačeny frakce číslo 7, 8 a 9 (eluční objem 10.5 – 11.5 ml) obsahující finální preparát proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ (vlastní zpracování).



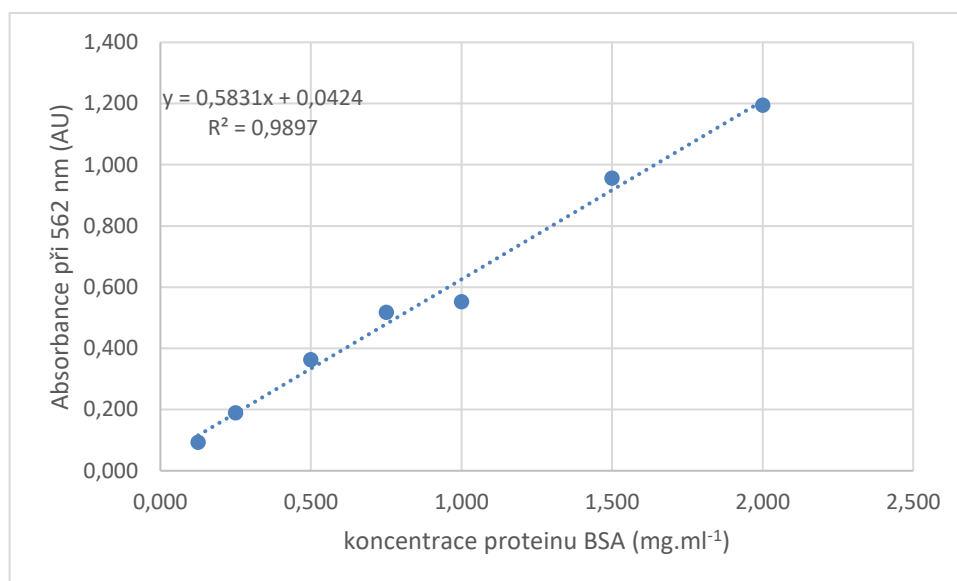
Obrázek 18. Záznam z gelové chromatografie prováděné při izolaci proteinu Bach1 v jeho „apoformě“. Červeně jsou vyznačeny frakce číslo 4, 5 a 6 (eluční objem 9.8 – 10.8 ml) obsahující finální preparát proteinu Bach1 v jeho „apoformě“ (vlastní zpracování).

Po spojení frakcí číslo 7, 8 a 9 z gelové chromatografie „holoformy“ proteinu Bach1 a jejich zakoncentrování bylo získáno 400 µl finálního preparátu, v němž byla stanovena koncentrace „holoformy“ proteinu Bach1 (viz kapitola 4.3.11). Mobilita frakcí 7, 8 a 9 odpovídala mobilitě proteinů s molekulovou hmotností 162 kDa. Eluční objem byl 10.5 – 11.5 ml. Po spojení frakcí číslo 4, 5 a 6 z gelové chromatografie „apoformy“ proteinu Bach1 a jejich zakoncentrování bylo získáno 350 µl finálního preparátu, v němž byla stanovena koncentrace této formy (viz kapitola 4.3.11). Mobilita frakcí 4, 5 a 6 odpovídala mobilitě proteinů s molekulovou hmotností 162 kDa. Eluční objem byl 9.8 - 10.8 ml. Vzorke odebraných frakcí i vzorky výsledných preparátů byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Zvolené frakce obsahovaly protein Bach1 o největší čistotě.

V získaných preparátech proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ i „apoformě“ byla stanovena koncentrace tohoto proteinu (viz kapitola 4.3.11). Změřené hodnoty absorbance vzorků standardu BSA spolu s koncentracemi BSA v příslušných vzorcích jsou zaznamenány v tabulce 5. Tabulka 5. Absorbance vzorků standardu BSA o příslušných koncentracích (vlastní zpracování). Ze získaných dat byl sestaven graf závislosti absorbance při 562 nm na koncentraci proteinu (viz obrázek 19, strana 60). Hodnota absorbance „holoformy“ proteinu Bach1 při 562 nm byla 0.168 AU. Hodnota absorbance „apoformy“ proteinu Bach1 při 562 nm byla 0.481 AU. Ze získané rovnice kalibrační přímky (viz obrázek 19, strana 60) byla vypočítána koncentrace proteinu Bach1 v jeho příslušné formě ve finálním preparátu. Tato koncentrace činila u finálního preparátu „holoformy“ proteinu Bach1 0.2 mg.ml⁻¹ a u finálního preparátu „apoformy“ proteinu Bach1 0.8 mg.ml⁻¹.

Tabulka 5. Absorbance vzorků standardu BSA o příslušných koncentracích (vlastní zpracování).

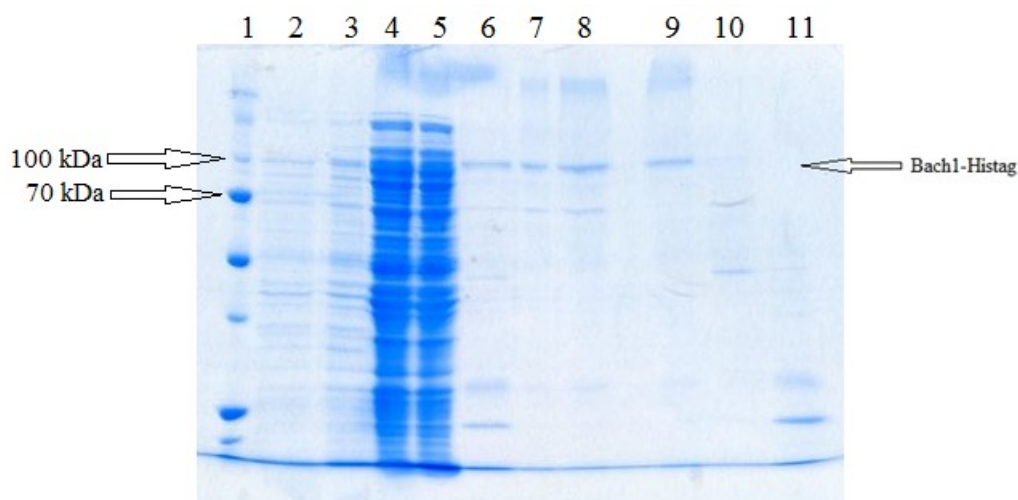
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Koncentrace BSA ve vzorku [mg/ml]	0.125	0.250	0.500	0.750	1.00	1.50	2.00
Absorbance při 562 nm [AU]	0.093	0.190	0.363	0.518	0.552	0.956	1.20



Obrázek 19. Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinu Bach1 ve finálním preparátu. Znázorněna je také rovnice této přímky (vlastní zpracování).

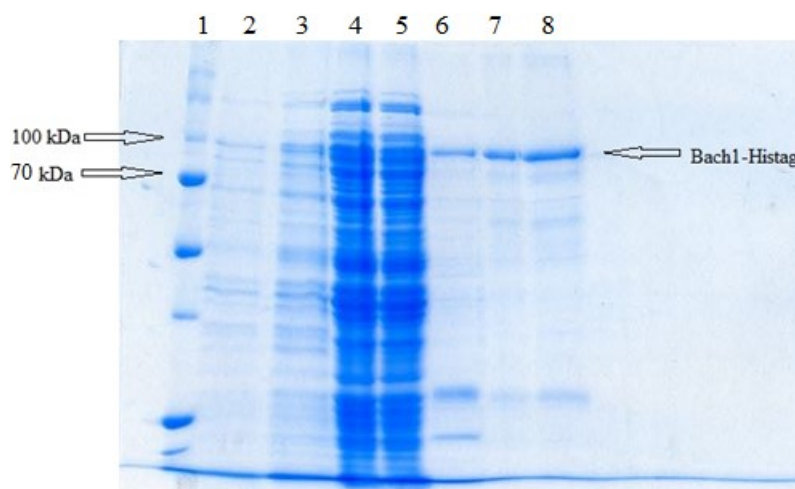
Ze 2 l TB média bylo získáno 263 µg finálního preparátu „apoformy“ proteinu Bach1 a ze stejného objemu média bylo získáno 88 µg finálního preparátu „holoformy“ proteinu Bach1.

Během izolace proteinu Bach1 byly odebrány následující vzorky pro oba paralelní izolační postupy (izolace proteinu Bach1, během které byl protein inkubován s roztokem heminu a také pro izolaci bez inkubace s heminem): supernatant po ultracentrifugaci, eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru, eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru, frakce číslo 5, 14 a 20 při separaci „holoformy“ proteinu Bach1 získané pomocí gelové chromatografie a finální preparát proteinu Bach1 (v „apoformě“ a „holoformě“) (ředění viz kapitola 4.3.10). S těmito vzorky byla provedena SDS elektroforéza (viz kapitola 4.3.10). Snímky výsledných gelů s popisem jednotlivých drah jsou uvedeny na obrázku 20 a na obrázku 21 (strana 61).



Obrázek 20. SDS elektroforéza vzorků odebraných během exprese a purifikace proteinu Bach1 v jeho "holoformě" (vlastní zpracování).

Dráha 1: standard Precision Plus Protein™ Standards; Dráha 2: buňky E. coli BL-21(DE3) před indukcí IPTG; Dráha 3: buňky E. coli BL-21(DE3) po indukcí IPTG; Dráha 4: supernatant po ultracentrifugaci; Dráha 5: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru; Dráha 6: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru; Dráha 7: izolovaný protein Bach1 (nádávkováno 7 µl); Dráha 8: finální preparát proteinu Bach1 (nádávkováno 15 µl); Dráha 9: frakce číslo 5 z gelové chromatografie (viz obrázek 17, strana 58); Dráha 10: frakce číslo 14 z gelové chromatografie (viz obrázek 17, strana 58); Dráha 11: frakce číslo 20 z gelové chromatografie (viz obrázek 17, strana 58).



Obrázek 21. SDS elektroforéza vzorků odebraných během exprese a purifikace proteinu Bach1 v jeho "apoformě" (vlastní zpracování).

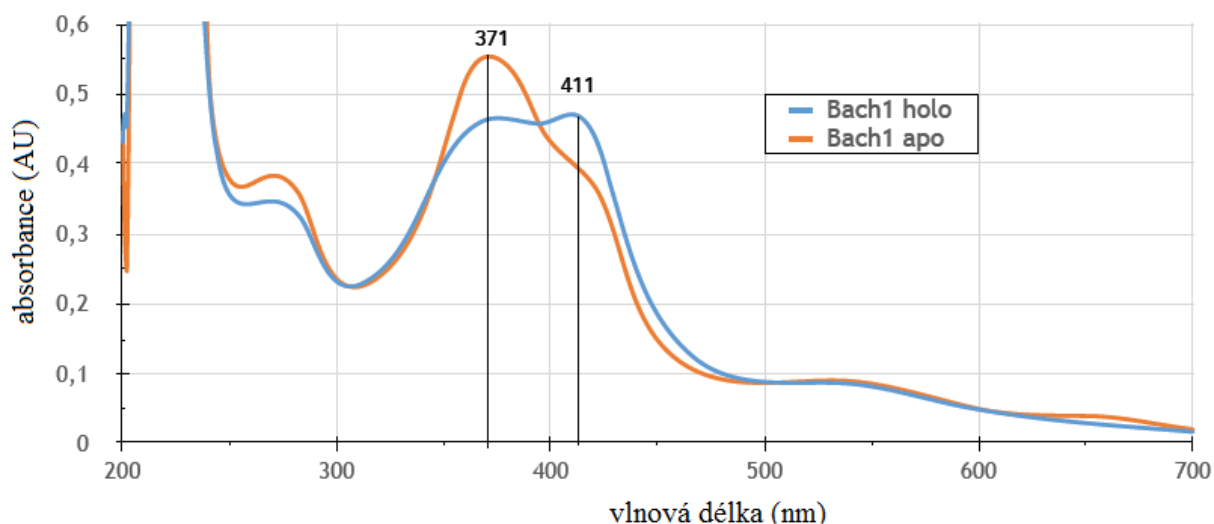
Dráha 1: standard Precision Plus Protein™ Standards; Dráha 2: buňky E. coli BL-21(DE3) před indukcí IPTG; Dráha 3: buňky E. coli BL-21(DE3) po indukcí IPTG; Dráha 4: supernatant po ultracentrifugaci; Dráha 5: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru; Dráha 6: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru; Dráha 7: izolovaný protein Bach1 (nádávkováno 7 µl); Dráha 8: finální preparát proteinu Bach1 (nádávkováno 15 µl).

Čistota získaného preparátu „holoformy“ Bach1 je cca 75 % a „apoformy“ je cca 80 %.

5.5 Základní charakterizace proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ a „apoformě“

Izolované preparáty proteinu Bach1 v jeho „holoformě“ i „apoformě“ byly spektrofotometricky charakterizovány (viz kapitola 4.3.12). Získané absorpční spektrum je znázorněno na obrázku 22. Soretův pás proteinu Bach1 byl nalezen v oblasti 371 nm a 411 nm.

Na základě kalibrace kolony pro gelovou chromatografii, lze z elučního objemu frakcí, jež obsahovaly protein Bach1 v nejvyšší čistotě (ověřeno SDS elektroforézou), usoudit, že se protein Bach1 vyskytuje přirozeně v roztoku ve formě dimeru, a to jak v jeho „apoformě“, tak v jeho „holoformě“.



Obrázek 22. Absorpční spektrum získaných preparátů proteinu Bach1 v jeho „apoformě“ (červená křivka, Fe(III)) a „holoformě“ (modrá křivka, Fe(III)) (vlastní zpracování).

6 Diskuze

Detailní rozbor současného stavu poznání týkajícího se transkripčního faktoru Bach1 je uveden v kapitole 2.4 (na stranách 22-25) této bakalářské práce. Rád bych upozornil na možnou souvislost proteinu Bach1 s nemocemi kardiovaskulárního či trávicího systému. Intenzivně je také studována souvislost tohoto proteinu s nemocemi imunitního systému a nemocemi souvisejícími s oxidativním stresem. Tyto medicínské souvislosti jsou významným důvodem pro důkladnější zkoumání proteinu Bach1. V literatuře související s tímto proteinem panuje mnoho nejasností. Nesetkal jsem se s žádnou studií, která nezmiňuje, zda u tohoto proteinu dochází k záměně ligandů při změně oxidačního čísla atomu železa v hemu. V rozporu jsou i závěry studií [35,38] o počtu molekul hemu, jež se vážou na protein Bach1. Zatímco Ogawa *et al.* [35] popisují interakci pouze jedné molekuly hemu s proteinem Bach1, Hira *et al.* [38] uvádí možnost vazby až pěti molekul hemu na protein Bach1. Z důvodu těchto diskrepancí a dalších nejasností týkajících se proteinu Bach1 bylo rozhodnuto studovat mechanismus detekce hemu v tomto případě detailněji. Cílem této bakalářské práce bylo připravit protein Bach1 expresí a následnou izolací z buněk *E. coli* BL-21(DE3). Součástí této bakalářské práce je jen předběžná charakterizace proteinu Bach1, jeho hlubší popis je plánován v průběhu dalšího studia.

Plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byl zaslán spolupracující laboratoří profesora Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan. Bylo zjištěno, že tento plazmid překvapivě obsahoval minimálně dvě mutace. Prvotní předběžnou sekvenací zasláního plazmidu nebyla ověřena sekvence celého genu pro Bach1. Gen je totiž příliš velký (2 217 párů bází) a pro určení jeho plné sekvence by bylo nutno navrhnout další „primery“. To však v danou chvíli nebylo učiněno, protože i tato předběžná sekvenace poskytla důležitou informaci – gen pro Bach1 nebyl v pořádku. Navíc hrozilo riziko výskytu dalších mutací v části genu, jejíž sekvence nebyla zjištěna. Bylo tedy rozhodnuto sekvenci genu pro Bach1 nijak neopravovat a dále s tímto plazmidem nepracovat. Místo toho byla spolupracující laboratoř požádána o zaslání nového materiálu. Během této následné komunikace bylo zjištěno, že spolupracující laboratoří zasláný plazmid byl před odesláním nevhodně skladován, což bylo pravděpodobně příčinou vzniklých mutací.

Na základě žádosti o další materiál byl do naší laboratoře zaslán japonskou spolupracující laboratoří plazmid pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag. Tento plazmid byl ovšem primárně určen pro expresi v eukaryotických buňkách, se kterou nikdo v naší laboratoři nemá zkušenost. Proto bylo rozhodnuto gen pro Bach1 přenést z plazmidu pcDNA3.1(-) do vektoru pET-21c(+) vhodného pro expresi v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). S využitím sekvenace byla nalezena v genu pro Bach1 jedna mutace a bylo zjištěno, že tato mutace se nachází již v zaslaném plazmidu pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag. Mutace tedy nevznikla manipulací s genem v naší laboratoři. K mutaci v genu pro Bach1 tedy mohlo dojít buď při transportu plazmidu z Japonska do České republiky, který zdržel administrativní úkon spojený s celním procesem, nebo k této mutaci došlo při manipulaci s genem v japonské laboratoři. Spolupracující laboratoř byla na tuto diskrepanci upozorněna. V dalším postupu bylo rozhodnuto nalezenou mutaci opravit metodou místně cílené mutageneze. Oprava byla úspěšně provedena, byl připraven plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag nesoucí gen pro Bach1 s histidinovou kotvou o správné sekvenci. Koncentrace takto získaného plazmidu, jenž je vhodný pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla 116.0 ng.μl⁻¹. Poměr absorbance při 260 nm ku absorbanci při 280 nm byl 1.53, získaný plazmid byl tedy mírně znečištěn balastním proteinem. Správnost sekvence genu pro Bach1 vloženém v připraveném vektoru byla ověřena sekvenací. Získaný plazmid byl tedy mírně znečištěn proteiny, nicméně byl využit pro expresi proteinu Bach1 a tato proběhla úspěšně.

Po expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla provedena jeho izolace a purifikace. Při těchto procesech byla snaha zaměřena na získání „apoformy“ (forma proteinu neobsahující hem) a „holoformy“ (forma proteinu obsahující hem) proteinu Bach1. Pro získání apoformy hemových proteinů bylo v literatuře popsáno několik způsobů. Prvním způsobem je užití organických rozpouštědel (například aceton v kyselém prostředí) pro odstranění hemu z proteinu. Tato metoda [49] se však provádí v silně nefyziologickém prostředí, kde je vysoká pravděpodobnost denaturace proteinu. Z důvodu aplikace silně denaturačního prostředí nebyla tato metoda v rámci předkládané práce použita. Druhá skupina metod přípravy apoformy hemového proteinu [20] využívá apoformu specifického mutantu myoglobinu s vysokou afinitou k hemu. Vlivem této vysoké afinity má zmíněný mutant schopnost odebrat molekulu hemu jiným hemovým proteinům, obzvlášť pokud jej vážou slabě. Výhodou uvedené metody je její provedení za fyziologických podmínek. Tuto metodu nebylo v rámci této bakalářské práce možno využít, neboť zmíněný mutant nebyl dostupný. Další možností přípravy apoformy hemového proteinu je jeho exprese bez hemových prekurzorů (například δ-aminolevulové kyseliny) a následná izolace bez přídavku hemu

(například ve formě heminu) [50]. Popsaného postupu bylo využito při expresi a izolaci proteinu Bach1 prováděné v rámci této práce. Připravit apoformu hemového proteinu je také možno pomocí mutace axiálních ligandů, nicméně tato metoda nebyla pro přípravu „apoformy“ proteinu Bach1 aplikovatelná vzhledem k neznalosti ligandového okolí molekuly hemu v tomto proteinu. Právě identifikace axiálních ligandů hemu je předmětem výzkumu v naší laboratoři.

Zvolená metoda přípravy „apoformy“ proteinu Bach1 (tj. exprese bez hemových prekurzorů jako δ -aminolevulová kyselina a následná izolace bez přidavku heminu) se ukázala být neúčinná. Získaný preparát „apoformy“ proteinu Bach1 obsahoval přibližně stejné množství hemu jako jeho „holoforma“ (viz obrázek 22, strana 62). Vzhledem k nízké produkci proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) pravděpodobně postačovala bazální produkce hemu zmíněnými bakteriálními buňkami pro inkorporaci hemu do všech molekul proteinu Bach1. V dalším výzkumu proteinu Bach1 bude pravděpodobně použita metoda přípravy „apoformy“ proteinu Bach1 využívající apoformu specifického mutantu myoglobinu s vysokou afinitou k hemu. Metoda využívající organických rozpouštědel probíhá v nefyziologickém prostředí, což by mohlo ještě snížit již tak relativně nízký výtěžek proteinu Bach1.

Velmi zajímavým zjištěním je, že preparát obsahující „apoformu“ proteinu Bach1 má v jeho UV-VIS spektru odlišný poměr zastoupení dvou Soretových píků než UV-VIS spektrum preparátu obsahující „holoformu“ proteinu Bach1 (viz obrázek 22 strana 62). Tuto diskrepanci zatím nelze vysvětlit. Její objasnění bude možné až po přesném popisu interakce proteinu Bach1 s hemem. Pozorovaný Soretův pás při 371 nm je ve shodě s publikovanými výsledky [38]. Nicméně Soretův pás pozorovaný při 411 nm není ve shodě s touto studií, v níž autoři našli Soretův pík při 421 nm. Důvodem této odlišnosti může být fakt, že v rámci této práce studujeme protein Bach1 v jeho plné délce, zatímco ve zmiňované publikaci autoři využili deleční mutanty proteinu Bach1.

Také je důležité zmínit, že míra produkce proteinu Bach1 v „holoformě“ i „apoformě“ je malá. Protein byl úspěšně exprimován, nicméně míra této exprese není velká (viz obrázek 20, strana 61, dráhy 2 a 3 a obrázek 21, strana 61, dráhy 2 a 3). Je třeba si uvědomit, že eukaryotický protein Bach1 byl v rámci této bakalářské práce produkován v prokaryotickém systému. Bach1 je také relativně velký protein, pro něj je podobně nízká míra exprese v prokaryotních systémech běžná [18].

Vzhledem k nízké úrovni exprese je i výtěžek izolace malý. Poměrně překvapivě byl výtěžek „holoformy“ proteinu Bach1 3.5krát nižší než výtěžek „apoformy“ proteinu Bach1.

Vysvětlení skýtají chromatogramy izolací těchto forem gelovou chromatografií (viz obrázek 17 a obrázek 18, strana 58). Při izolaci „holoformy“ proteinu Bach1 gelovou chromatografií byl patrný vznik velkého množství oligomerů či agregátů (viz obrázek 17, strana 58). Identifikace těchto oligomerů či agregátů bude prováděna během dalších studií proteinu Bach1. Mohlo by se jednat například o tetramery, oktamery či nestrukturované agregáty. Při izolaci „apoformy“ proteinu Bach1 gelovou chromatografií bylo pozorováno výrazně nižší množství oligomerů či agregátů, což vedlo k mnohem vyššímu výtěžku „apoformy“ proteinu Bach1. Výskyt těchto oligomerů či agregátů měl pravděpodobně také vliv na čistotu získaných preparátů, jež v případě „apoformy“ proteinu Bach1 činila asi 80 % a v případě „holoformy“ proteinu Bach1 asi 75 %. Pro přípravu proteinu Bach1 se tedy zdá být výhodnější pouze jeho exprese v přítomnosti bakteriemi bazálně produkovaného hemu. Přídavek heminu během izolace vedl ke snížení výtěžku a vyššímu znečištění izolovaného proteinu. Je možné, že inkubace izolovaného preparátu s volným hemem zatížila preparát oxidativním stresem, který se posléze projevil ve vyšší tendenci daného proteinu tvořit agregáty. S využitím metody gelové chromatografie bylo potvrzeno, že „holoforma“ i „apoforma“ proteinu Bach1 se přirozeně vyskytují jako dimery. Vzhledem k tomu, že izolovaná „apoforma“ proteinu Bach1 není pravou „apoformou“, která neobsahuje hem, nemůžeme na tomto místě činit žádný závěr o tom, zda nepřítomnost hemu ve struktuře Bach1 má vliv na jeho oligomerní stav.

Postup izolace proteinu Bach1 bude pravděpodobně v budoucnu optimalizován. Například během afinitní chromatografie bude možno využít různé koncentrace imidazolu v elučním pufru pro získání většího množství finálního preparátu proteinu Bach1. Budou také testována různá další redukční činidla, protože molekula Bach1 obsahuje velké množství cysteinových zbytků (konkrétně 36). Závěrem je třeba konstatovat, že exprese i izolace proteinu Bach1 proběhla úspěšně. Prvotní charakterizace přinesla zajímavé informace, nicméně ve studiu tohoto proteinu bude potřeba dále intenzivně pokračovat.

7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem myšího senzorového proteinu Bach1, který detekuje hem. Stanovené cíle bakalářské práce byly naplněny, konkrétně bylo dosaženo těchto výsledků:

- Bylo zjištěno, že plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag zaslaný spolupracující laboratoří profesora Kazukiho Igarashiho, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan obsahoval minimálně dvě mutace.
- Výše uvedenou spolupracující laboratoří byl poskytnut další plazmid. Tentokrát se jednalo o vektor pcDNA3.1(-)/Bach1-Histag. Tento plazmid byl určen primárně pro expresi proteinu Bach1 v eukaryotických buňkách, navíc také obsahoval jednu mutaci.
- Gen pro protein Bach1 byl přenesen z vektoru pcDNA3.1(-) do vektoru pET-21c(+) vhodného pro expresi proteinu v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). Mutace v genu pro Bach1 byla úspěšně opravena pomocí metody místně cílené mutagenese. S využitím těchto manipulací byl získán plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag, který nesl požadovaný gen prostý jakékoliv nežádoucí mutace, a který je vhodný pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). Koncentrace takto získaného plazmidu v roztoku byla 116.0 ng.μl⁻¹.
- Protein Bach1 byl po indukci IPTG úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). Z celkového objemu 4 l TB média bylo získáno 21.6 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které obsahovaly exprimovaný protein Bach1.
- Z 10.8 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem Bach1 získaných ze 2 l TB média bylo připraveno 88 μg „holoformy“ proteinu Bach1. Z 10.8 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem Bach1 získaných ze 2 l TB média bylo připraveno 263 μg „apoformy“ proteinu Bach1. Celkem bylo připraveno 351 μg proteinu Bach1, výtěžek je tedy cca 0.1 mg proteinu Bach1 z 1 l TB média (resp. z 5 g buněk *E. coli* BL-21(DE3)).
- Čistota izolovaných preparátů Bach1 byla kolem 80 %.
- Získané preparáty proteinu Bach1 byly předběžně charakterizovány pomocí UV-VIS spektroskopie a gelové chromatografie.

8 Seznam použitých zdrojů

1. Smith LJ, Kahraman A, Thornton JM. 2010. Heme proteins-Diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78:2349–2368.
2. kolektiv autorů, Univerzita Karlova. 2009. *Biochemie: základní kurz*. Karolinum, Praha.
3. Murray RK. 2002. *Harperova biochemie*. H & H, Praha.
4. Voet D, Kotyk A, Geis I, Pecák M, Voet JG. 1995. *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha.
5. National Center for Biotechnology Information. 2017. Heme. *PubChem Compd. Database*. dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444098>, stav k 18.5. 2017.
6. Igarashi J, Kitanishi K, Shimizu T. 2010. Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. *Handb. Porphyrin Sci.* World Scientific Publishing, Hackensack, NJ, USA, pp 399–460.
7. Igarashi J, Kitanishi K, Martinkova M, Murase M, Iizuka A, Shimizu T. 2007. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim. Slov.*:67–74.
8. Murray RK, Matouš B. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Galén, Praha.
9. Ditta, Gary S, Helinski, Donald R, Gilles-Gonzalez, Marie A. 1991. A Haemoprotein with Kinase Activity Encoded by the Oxygen Sensor of *Rhizobium Meliloti*. *Nat. Lond.*:170–172.
10. Tagliabue L, Maciag A, Antoniani D, Landini P. 2010. The yddV-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:477–484.
11. Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager TA, Hacker J, Ron EZ. 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 69:2659–2665.
12. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell. Microbiol.* 9:2230–2241.
13. Banerjee R, Zou C-G. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:144–156.
14. Girvan HM, Munro AW. 2013. Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.* 288:13194–13203.
15. Zhang L, Guarente L. 1995. Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14:313–320.

16. A. Iizuka, Igarashi J, Shimizu T. 2007. Abstract for the 15th International Conference on Cytochromes P450 - Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics. Bled, Slovenia, p 182.
17. Shimizu T, Hikage N, Kitanishi K, Murase M, Iizuka A, Ishikawa S, Ishitsuka K, Saiful I, Yamauchi A, Tanaka A, Martinkova M, Igarashi J, Sagami I. 2007. Abstract for the 15th International Conference on Cytochromes P450 - Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics. Bled, Slovenia, pp 31–38.
18. Miksanova M, Igarashi J, Minami M, Sagami I, Yamauchi S, Kurokawa H, Shimizu T. 2006. Characterization of heme-regulated eIF2 α kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition. *Biochemistry (Mosc.)*. 45:9894–9905.
19. Mukaiyama Y, Uchida T, Sato E, Sasaki A, Sato Y, Igarashi J, Kurokawa H, Sagami I, Kitagawa T, Shimizu T. 2006. Spectroscopic and DNA-binding characterization of the isolated heme-bound basic helix-loop-helix-PAS-A domain of neuronal PAS protein 2 (NPAS2), a transcription activator protein associated with circadian rhythms. *FEBS J*. 273:2528–2539.
20. Hargrove MS, Singleton EW, Quillin ML, Ortiz LA, Phillips GN, Olson JS, Mathews AJ. 1994. His64(E7)-->Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of heme dissociation. *J. Biol. Chem.* 269:4207–4214.
21. Hargrove MS, Barrick D, Olson JS. 1996. The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry (Mosc.)*. 35:11293–11299.
22. Pellicer S, González A, Peleato ML, Martínez JI, Fillat MF, Bes MT. 2012. Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein: Heme iron ligation by Fur. *FEBS J*. 279:2231–2246.
23. Igarashi J, Murase M, Iizuka A, Pichierri F, Martinkova M, Shimizu T. 2008. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* 283:18782–18791.
24. Yang J, Ishimori K, O'Brian MR. 2005. Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *J. Biol. Chem.* 280:7671–7676.
25. Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M-A, McKnight SL. 2002. NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science*. 298:2385–2387.
26. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. 2001. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*. 293:506–509.
27. Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL. 2001. Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science*. 293:510–514.

28. Miloš Langmeier a kolektiv. 2009. *Základy lékařské fyziologie*. Grada publishing, a.s., Praha.
29. Zhou Y, Wu H, Zhao M, Chang C, Lu Q. 2016. The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 50:345–356.
30. 2017. Uniprot. dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P97302>, stav k 18.5. 2017.
31. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M, Igarashi K. 1996. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* 16:6083–6095.
32. Blouin J-L, Duriaux Saïl G, Guipponi M, Rossier C, Pappasavas M-P, Antonarakis SE. 1998. Isolation of the human BACH1 transcription regulator gene, which maps to chromosome 21q22.1. *Hum. Genet.* 102:282–288.
33. Igarashi K, Hoshino H, Muto A, Suwabe N, Nishikawa S, Nakauchi H, Yamamoto M. 1998. Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for beta-globin locus control region complex. *J. Biol. Chem.* 273:11783–11790.
34. Igarashi K, Watanabe-Matsui M. 2014. Wearing red for signaling: the heme-bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. *Tohoku J. Exp. Med.* 232:229–253.
35. Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K. 2001. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* 20:2835–2843.
36. Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K. 2004. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* 23:2544–2553.
37. Katsuoka F, Yamamoto M. 2016. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene.* 586:197–205.
38. Hira S, Tomita T, Matsui T, Igarashi K, Ikeda-Saito M. 2007. Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life.* 59:542–551.
39. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. 2012. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820:161–187.
40. Opekar F, Jelínek I, Rychlovský P, Plzák Z. 2010. *Základní analytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
41. Cammack R, Attwood TK. 2006. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford Univ. Press, Oxford.

42. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/3923.
43. Hengen PN. 1995. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 20:285–286.
44. Rosypal S. 2002. *Úvod do molekulární biologie. Čtvrtý díl, Čtvrtý díl.*. Stanislav Rosypal, Brno.
45. Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113–130.
46. 2017. SnapGene. dostupné z: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-21c\(+\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-21c(+)/), stav k 18.5. 2017.
47. 2017. SnapGene. dostupné z: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pcDNA3.1\(-\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pcDNA3.1(-)/), stav k 18.5. 2017.
48. Bach1 - Transcription regulator protein BACH1 - *Mus musculus* (Mouse) - Bach1 gene & protein. dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P97302>, stav k 18.5 2017.
49. Yamazaki H, Johnson WW, Ueng Y-F, Shimada T, Guengerich FP. 1996. Lack of Electron Transfer from Cytochrome b5 in Stimulation of Catalytic Activities of Cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.* 271:27438–27444.
50. Fojtikova V, Stranova M, Vos MH, Liebl U, Hranicek J, Kitanishi K, Shimizu T, Martinkova M. 2015. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Histidine Kinase, *AfGcHK*: Effects of the Heme Iron Complex, Response Regulator, and Metal Cations on Autophosphorylation Activity. *Biochemistry (Mosc.)*. 54:5017–5029.